

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Shirley LONGACRE-ANDRE et al.

SERIAL NUMBER: New U.S. Application

FILED: Herewith

FOR: RECOMBINANT PROTEIN CONTAINING A C-TERMINAL FRAGMENT OF PLASMODIUM MSP-1

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants
claim as priority:

COUNTRY

APPLICATION NO:

MONTH/DAY/YEAR

FRANCE

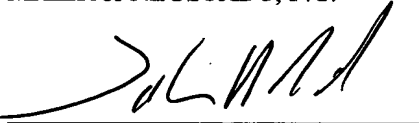
FR 96/01822

February 14, 1996

A Certified copy of the corresponding Convention Application will be submitted prior to payment of
the final fee as will any required documentation.

Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618

John K. Pike, Ph.D.
Registration No. 41,253

Fourth Floor
1755 Jefferson Davis Highway
Arlington, Virginia 22202
(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220



THIS PAGE BLANK (USPTO)

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: SHIRLEY LONGACRE-ANDRE ET AL

GAU: 1644

SERIAL NO: 09/134,333

EXAMINER: TURNER

FILED: AUGUST 14, 1998

FOR: RECOMBINANT PROTEIN CONTAINING A C-TERMINAL FRAGMENT OF PLASMODIUM MSP-1

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

COUNTRY

FRANCE

APPLICATION NUMBER

96/01822

MONTH/DAY/YEAR

FEBRUARY 14, 1996

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ is submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Registration No. 24,618

William E. Beaumont
Registration No. 30,996



THIS PAGE BLANK (USPTO)

GUTHANOV - PLASDERAUD
S.A.

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **11 AVR. 2000**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN TITRE DE PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE *

1

a	<input checked="" type="checkbox"/> BREVET D'INVENTION
b	<input type="checkbox"/> CERTIFICAT D'UTILITÉ
c	<input type="checkbox"/> DEMANDE DIVISIONNAIRE
d	<input type="checkbox"/> TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN

Pour c et d, précisez : Nature, N° et date de la
demande initiale

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFÈRE
DU RAPPORT DE RECHERCHE *

☐ OUI
☒ NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ OUI
☐ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

DATE DE REMISE DES PIÈCES

14-02-96

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96 01822-

DATE DE DÉPÔT

14 FEV. 1996

CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT

75

4 NUMÉRO DU POUVOIR PERMANENT

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT

B3044 - EG

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT

44-51-18-00

7 TITRE DE L'INVENTION

PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT

C-TERMINAL DE LA PROTEINE MSP-1

D'UN PLASMODIUM INFECTIEUX POUR L'HOMME

POUR LA PRODUCTION DE VACCINS ANTI-PALUDIQUES

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

INSTITUT PASTEUR

Fondation privée reconnue d'utilité publique

N SIREN

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

25-28, rue du Dr. Roux
75724 PARIS CEDEX 15

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

FRANCAISE

DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

DE RAPPORT DE RECHERCHE

DE REVENDICATION DE PRIORITÉ

DE REVENDICATION (à partir de la 11a)

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR *

☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT* OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES*

☐ OUI

☐ NON

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

DU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES A LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15

SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE-N° D'INSCRIPTION

ERNEST GUTMANN - YVES
PLASSERAUD S.A.
GUTMANN Ernest n° 92-1106

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ A LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI

* Cocher la case choisie

LES ENCADRÉS GRAS SONT RÉSERVÉS A L'ADMINISTRATION

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

96 01822

TITRE DE L'INVENTION :

**PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT LA SEQUENCE C-TERMINALE DE 19kDa
D'UNE PROTEINE MSP-1 D'UN PLASMODIUM INFECTIEUX POUR L'HOMME OU UN
FRAGMENT DE CELLE-CI POUR LA PRODUCTION DE VACCINS ANTI-PALUDIQUES.**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

**ERNEST GUTMANN-
YVES PLASSERAUD S.A.
3 rue Chauveau-Lagarde
75008 PARIS (France).**

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

**1) LONGACRE-ANDRE Shirley
11 rue d'Assas - 75006 PARIS (France)**

**2) ROTH Charles
C/O Madame Agnès RIMOND
18 rue Geneviève Couturier - 92500 RUEIL MALMAISON (France)**

**3) NATO Faridabano
65 rue Mirabeau - 92160 ANTONY (France)**

**4) BARNWELL John W.
3 Washington Square Village - Apartment 10 D
NEW YORK N.Y. 10012 (USA)**

**4) MENDIS Kamini
P.O. Box 271, Kynsey Road
COLUMBO 8 - SRI LANKA**

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 24 février 1997

**Ernest GUTMANN
CPI n° 92-1106**

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDI- CATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
M difiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
1,5,12,30				31/07/96	05 AOUT 1996 - S.R
34,35,37,38			X	31/07/96	05 AOUT 1996 - S R
Planches non numérotées (129/9)		Planches 40 et 41/44		09/08/96	26 AOUT 1996 - S R
31			X	24.02.97	10 OCT. 1997 - S R

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article 28 du décret du 19 septembre 1979, est signalé par la mention "R.M." (revendications modifiées).

**PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT LA SEQUENCE
C-TERMINALE DE 19kDa D'UNE PROTEINE MSP-1
D'UN *PLASMODIUM* INFECTIEUX POUR L'HOMME
OU UN FRAGMENT DE CELLE-CI
POUR LA PRODUCTION DE VACCINS ANTI-PALUDIQUES**

5

10

L'invention concerne de nouveaux principes actifs de vaccins dérivés de la protéine majeure de surface de formes mérozoïtes d'un *Plasmodium* infectieux pour l'homme, plus généralement connue sous la désignation MSP-1.

15

20

Cette protéine a déjà fait l'objet d'études nombreuses. Elle est synthétisée dans le stade schizonte des parasites du type *Plasmodium*, notamment *Plasmodium falciparum*, et est exprimée sous forme de l'un des constituants majeurs de la surface des mérozoïtes aussi bien pendant le stade hépatique que pendant le stade érythrocytaire du paludisme (1, 2, 3, 4). En raison du caractère prédominant et de la conservation dans toutes les espèces de *Plasmodium* connues de cette protéine, il a été suggéré qu'elle pourrait représenter un candidat pour la constitution de vaccins anti-paludiques (5, 6).

25

30

Il en a encore été de même pour des fragments de cette protéine, particulièrement des produits naturels de clivage dont l'on observe la formation, par exemple au cours de l'invasion par le parasite des érythrocytes de l'hôte infecté. Parmi, ces produits de clivage, on relèvera le fragment C-terminal ayant un poids moléculaire de 42 kDa (7,8) qui est à son tour clivé une nouvelle fois en un fragment N-terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 33 kDa et en un fragment C-terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 19 kDa (9) qui reste normalement fixé à la membrane du parasite au terme des modifications dont il est lui-même l'objet, par l'intermédiaire de groupes du type glycosylphosphatidylinositol (GPI) (10, 11).

On le retrouve encore au stade anneau précoce du cycle de développement intraérythrocytaire (15, 16), d'où les observations qui ont été faites que ce fragment de 19 kDa pourrait jouer un rôle non encore connu, mais sans doute essentiel dans les processus réinvasifs. De là
 5 découlent les hypothèses déjà formulées dans le passé que cette protéine pourrait constituer une cible particulièrement efficace pour d'éventuels vaccins.

Il sera entendu que les références souvent faites dans ce qui suit à
 des protéines p42 et p19 issues d'un certain type de *Plasmodium*
 10 s'entendent comme se rapportant aux produits de clivage C-terminaux correspondants de la protéine MSP-1 de ce *Plasmodium*, ou, par extension, à des produits contenant sensiblement les mêmes séquences en acides aminés, obtenus par recombinaison génétique ou par synthèse chimique selon les techniques classiques, par exemple par synthétiseur de
 15 type « Applied System » ou par synthèse sur phase solide de type « Merrifield ». Pour la commodité du langage, les références à des « p42 recombinantes » et des « p19 recombinantes » se rapportent à des « p42 » et « p19 » obtenues par des techniques comportant au moins une étape de génie génétique.

20 Devant la difficulté d'obtenir des quantités importantes de parasites pour *P.falciparum* et l'impossibilité de cultiver *P.vivax in vitro*, il est devenu évident que le seul moyen de produire un vaccin antipaludique nécessite un recours aux techniques permettant l'utilisation des peptides ou protéines recombinantes. Mais, le MSP-1 est très difficile à produire en
 25 entier à cause de sa grande taille d'environ 200 kDa, un fait qui a conduit les chercheurs à s'intéresser à la partie C-terminale dont la fonction, encore inconnue, est vraisemblablement la plus importante.

Au titre, des protéines recombinantes concernant la partie C-terminale de MSP-1 de *P.falciparum*, qui ont été produites et testées chez
 30 le singe (12), on mentionnera :

- une p42 fusionnée avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli*;
- une p19 fusionnée avec un polypeptide issu d'une anatoxine tétanique et porteur d'épitopes de cellules T auxiliaires produites dans *S.cerevisiae*.

Une composition contenant la protéine de fusion p42 avec une glutathione-S-transférase produite dans *E.coli* en association avec un adjuvant complet de Freund n'ont pas exercé d'effet protecteur dans les deux types de singes *Aotus* (*A.nancymai* et *A.vociferans*) auxquels elles avaient été administrées. La protéine p19 produite dans *S.cerevisiae* a exercé un effet protecteur dans deux singes *Aotus* de type *A.nancymai* (12). Par contre elle n'a pas exercé d'effet protecteur dans deux singes *Aotus* de type *A.vociferans*.

Certains chercheurs (Chang et al.) ont également rapporté des essais d'immunisation réalisés chez le lapin avec une protéine recombinante p42 produite dans un système baculovirus et contenant une séquence d'acides aminés en commun avec *P.falciparum* (18). Ainsi ces derniers auteurs indiquent-ils que cette p42 recombinante se comporte chez le lapin sensiblement de la même façon que la protéine MSP-1 recombinante entière (gp195). Ils suggèrent que la protéine p42 pourrait faire l'objet d'essais de protection dans des primates non-humains susceptibles à l'infection par *P.falciparum*, en particulier des singes *Aotus*, au motif que la protéine p42 comporterait des épitopes-cibles pour des anticorps inhibiteurs formés contre la protéine MSP-1 native purifiée gp195. Il serait néanmoins hasardeux, à supposer même que de tels résultats soient un jour confirmés, de conclure au caractère protecteur chez l'homme des anticorps ainsi induits à l'encontre des parasites eux-mêmes. Rappelons en effet qu'il n'existe pas actuellement de modèles expérimentaux très satisfaisants chez le primate pour *P. vivax* et *P.falciparum*. Le modèle *Saimiri*, qui a été développé pour *P.falciparum* et *P.vivax*, et le modèle *Aotus* pour *P.falciparum*, sont des systèmes

artificiels, nécessitant l'adaptation de souches de parasite et souvent la splénectomie des animaux pour obtenir des parasitémiées significatives. En conséquence, les résultats de vaccination provenant de ces modèles ne peuvent avoir qu'une valeur prédictive limitée pour l'Homme.

5 On peut de toute façon aussi s'interroger sur ce que serait un taux réel de vaccination susceptible d'être éventuellement obtenu avec de telles protéines recombinantes, compte tenu de la constatation -rapportée plus loin- qui a été faite de la présence dans les p42 issues des *Plasmodiums* de la même espèce, et plus particulièrement dans les p33
10 correspondantes, de régions hypervariables qui rendraient aléatoires en de nombreux cas l'efficacité immunoprotectrice des anticorps induits chez des personnes vaccinées par une p42 issue d'une souche de *Plasmodium* à l'encontre d'une infection par d'autres souches de la même espèce (13).

On peut même supposer que le polymorphisme important de la
15 partie N-terminale du p42 joue un rôle significatif dans l'échappement immunitaire, souvent observé pour ce type de parasites.

La présente invention a pour objectif la production de protéines recombinantes vaccinales échappant à ces difficultés, dont l'effet protecteur est vérifiable dans des modèles expérimentaux réellement
20 significatifs, ou même directement chez l'homme.

L'invention concerne plus particulièrement des compositions vaccinales contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif une protéine recombinante glycosylée ou non, dont la séquence polypeptidique constitutive
25 essentielle est celle :

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de
30 pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;

- soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à ^{induire} ~~(réponse immunitaire capable d'inhiber une)~~ ~~une parasitémie normalement induite~~ in vivo ~~par le~~ ^{due au} parasite correspondant ;
- soit d'un peptide immunologiquement équivalent à ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant, de préférence, la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

La présence de ces épitopes conformationnels pourrait jouer un rôle important dans l'efficacité protectrice du principe actif de vaccins. On les retrouve tout particulièrement dans les principes actifs présentant par ailleurs les autres caractéristiques définies ci-dessus, lorsqu'ils ont été produits dans un système vecteur baculovirus. S'il en est besoin, il est mentionné ci-après que par l'expression « système de vecteur baculovirus » on entend l'ensemble que constitue le vecteur type baculovirus lui-même et les lignées cellulaires, notamment cellules d'insectes transfectables par un baculovirus modifié par une séquence à transférer dans ces lignées cellulaires avec pour résultat l'expression de cette séquence transférée. Des exemples préférés de ces deux partenaires du système baculovirus, ont été décrits dans l'article de Longacre et al. (19). C'est le même système qui a été utilisé dans les exemples qui suivent. Il va naturellement de soi que des variants, tant du baculovirus que des cellules infectables par ce baculovirus peuvent être utilisés en lieu et place de celui qui a été choisi.

Le caractère instable en milieu réducteur de ces épitopes conformationnels peut être mis en évidence, notamment par le test décrit plus loin dans les exemples, notamment en présence de β -mercaptoéthanol.

De ce point de vue, la protéine recombinante produite par S. Longacre et al. (14) peut être mise en oeuvre dans de tels compositions.

Il est rappelé que S. Longacre et al. réussirent à produire une p19 recombinante issue de la MSP-1 de *P. vivax* dans un système vecteur à baculovirus contenant une séquence nucléotidique codant pour la p19 de *Plasmodium vivax*, en particulier par transfection de cultures de cellules d'insectes [lignée de *Spodoptera frugiperda* (Sf9)] avec des baculovirus vecteurs contenant, sous le contrôle du promoteur de la polyhédrine, une séquence codant pour les fragments peptidiques définis ci-dessous, dont les séquences étaient placées dans l'ordre suivant dans le vecteur baculovirus utilisé :

- 10 • fragment 5'-terminal de 35 paires de bases de la séquence signal de la polyhédrine, dont avait été muté (en ATT) le codon méthionine d'initiation de l'expression de cette protéine;
- un fragment 5'-terminal nucléotidique codant pour un peptide de 32 acides aminés correspondant à la partie N-terminale de MSP-1, y compris le peptide signal de MSP-1 ;
- 15 • soit une séquence nucléotidique codant pour la p19, soit une séquence codant pour la p42 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium vivax*, ces séquences étant aussi, selon le cas, soit pourvues (formes « ancrées »), soit dépourvues (formes solubles) des régions d'extrémité 3' de ces séquences de nucléotides dont les produits d'expression C-terminaux extrêmes sont réputés jouer un rôle essentiel dans l'ancrage de la protéine finale p19 sur la membrane du parasite ;
- 20 • 2 codons stop TAA.

Pour la p42, les séquences dérivées de la région C-terminale de MSP-1 s'étendaient par conséquent de l'acide aminé Asp 1325 à l'acide aminé Leu 1726 (forme ancrée) ou à l'acide aminé Ser 1705 (forme soluble) et pour la p19, les séquences s'étendaient de l'acide aminé Ile 1602 à l'acide aminé Leu 1726 (forme ancrée) ou à l'acide aminé Ser 1705 (forme soluble), étant entendu que les séquences en acides aminés complètes de p42 et p19 dont les acides aminés initiaux et terminaux ont

été indiqués dans ce qui précède découlent du gène de l'isolat Belem de *P.vivax* qui a été séquencé (20).

Des résultats semblables ont été obtenus en mettant en oeuvre dans les mêmes systèmes, de vecteurs des séquences nucléotidiques codant pour la p42 et la p19 de *Plasmodium cynomolgi*. *P.cynomolgi* présente un double intérêt : c'est une espèce parasitaire très proche de *P.vivax* qui est infectieuse pour le macaque. Il peut aussi infecter l'Homme. On a également accès à des hôtes naturels de *P.cynomolgi*, les singes rhésus et les singes toques, pour tester l'efficacité de protection du MSP-1 de *P.cynomolgi* dans des systèmes naturels. Le singe rhésus est considéré comme une des espèces les plus représentatives des réactions immunitaires chez l'Homme.

En particulier, on a obtenu d'excellents résultats dans des essais de vaccination réalisés chez le singe toque avec deux polypeptides recombinants : la p42 et, surtout, la p19 solubles, dérivées de *P.cynomolgi*, respectivement produites dans un système baculovirus et purifiées sur colonne d'affinité avec des anticorps monoclonaux reconnaissant les régions correspondantes de la protéine MSP-1 native. Les observations suivantes ont été faites : les six singes immunisés avec le seul p19 (trois singes) et le 19 et p42 ensemble (3 singes) ont tous témoigné d'une immunité presque stérile après infection d'épreuve. Les résultats obtenus chez les trois singes immunisés avec le p42 ont été moins significatifs. Deux d'entre eux se sont comportés comme les précédents, mais si le troisième a manifesté une parasitémie moins importante que des témoins immunisés avec un tampon PBS en présence de l'adjuvant de Freund (3 singes) ou non immunisés (3 singes), elle n'en n'était pas moins patente.

Les résultats des essais particulièrement efficaces réalisés chez le macaque avec des polypeptides recombinants produits dans un système baculovirus mettant en oeuvre une p19 recombinante de *P.cynomolgi*, établissent que des polypeptides recombinants contenant respectivement des p19 recombinantes issus d'autres *Plasmodiums* doivent se comporter

de la même manière. Ils sont « plus parlants » pour le paludisme chez l'Homme que les résultats d'essais réalisés avec *P.vivax* ou *P.falciparum* dans leurs « hôtes artificiels ».

5 Les protéines recombinantes de baculovirus, dérivées d'une partie C-terminale de MSP-1 (p19), ont un effet protecteur antipaludique très significatif dans un système naturel, qui constitue le modèle d'évaluation de l'effet protecteur de MSP-1 le plus représentatif pour l'homme.

10 L'effet protecteur obtenu pourrait être d'autant meilleur que la forme p19 est dépourvue de la région hypervariable de la partie N-terminale du p42, dont l'effet peut être délétère dans des situations naturelles dans lesquelles le sujet vacciné est confronté à un polymorphisme important.

15 Le fragment C-terminal de 19 kDa dont la séquence est présente dans le principe actif du vaccin peut être limité à la séquence de la p19 elle-même, en l'absence de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence de p19 dans la protéine MSP-1 correspondante. Il va néanmoins de soi que la séquence polypeptidique constitutive essentielle du principe actif peut encore comporter une séquence polypeptidique du côté C-terminal appartenant au fragment N-terminal de 33 kDa (p33) encore associée à la p19 dans la p42 correspondante, avant
20 le clivage naturel de cette dernière, et cela chaque fois que la présence de ce fragment n'est pas de nature à modifier les propriétés immunologiques du principe actif du vaccin. Comme cela sera vu plus loin, notamment à propos de la description des exemples, les séquences C-terminales de la p33 de variétés diverses de *Plasmodium* (voir la partie C-terminale des
25 séquences peptidiques de la « région III » de la figure 4), présentent aussi encore un degré d'homologie ou de conservation substantielle de la séquence, par exemple de l'ordre de 80% au moins, dans différentes variétés de *Plasmodiums* infectieux pour l'homme, de sorte qu'elles ne
30 sont pas de nature à modifier fondamentalement les propriétés vaccinales du principe actif (dont la séquence correspond à la région IV) de la figure 4, en particulier dans l'hypothèse qui découle de cette figure le

site de clivage présumé entre la p19 et la région III de la p33 se situe entre les résidus leucine et asparagine dans une région particulièrement bien conservée (LNVQTQ).

5 Normalement la séquence polypeptidique C-terminale de la p33, lorsqu'elle est présente, comprend moins de 50 résidus d'acides aminés, voire même moins de 35, ou même moins de 10 résidus d'acides aminés.

A l'inverse, la séquence polypeptidique constitutive essentielle du principe actif de vaccin peut ne pas comporter la totalité de la séquence
 ----- codant pour la p19, naturellement sous réserve que cette dernière -----
 10 conserve la capacité d'induire des anticorps protecteurs contre le parasite. En particulier la susdite « partie de fragment a un poids moléculaire de 10 à 25 kDa, notamment de 10 à 15 kDa. De préférence, cette partie de fragment polypeptidique contient au moins l'une des deux régions EGF (abréviation de l'expression anglaise « Epidermal Growth Factor »).

15 Il est clair que l'homme du métier est à même de faire la différence entre les fragments actifs et ceux qui cesseraient de l'être, notamment de façon expérimentale en produisant des vecteurs modifiés contenant des insérats issus de la p19 de longueurs différentes, respectivement isolés à partir des fragments obtenus à partir de la séquence codante pour la p19,
 20 par réaction avec des enzymes de restriction appropriés, ou encore par des enzymes exonucléolytiques qui auraient été maintenus au contact du fragment codant pour la p19 pendant des temps variables ; la capacité des produits d'expression de ces insérats dans des cellules eucaryotes correspondantes, notamment des cellules d'insectes, transformées par les
 25 vecteurs modifiés correspondants, à exercer un effet protecteur, pouvant alors être testée, notamment dans les conditions expérimentales qui seront décrites plus loin, à propos des exemples. En particulier, les produits d'expression de ces insérats doivent être aptes à inhiber une parasitémie induite *in vivo* par le parasite correspondant entier.

30 De même, l'invention inclut toutes compositions vaccinales dans lesquelles la séquence polypeptidique constitutive essentielle du principe

actif serait constitué d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par la p19 ou au fragment tel qu'il vient d'être défini, dès lors que l'addition, la délétion ou la substitution dans sa séquence de certains acides aminés par d'autres n'entraîneraient pas une modification importante de la capacité du peptide ainsi modifié -ci-après appelé « peptide immunologiquement équivalent »- à aussi inhiber la susdite parasitémie.

Le fragment de la p19 peut naturellement aussi être associé que ce soit du côté N-terminal ou du côté C-Terminal ou par l'intermédiaire d'une liaison peptidique à un autre fragment de protéine plasmodiale ayant un potentiel vaccinant comme par exemple une protéine (« Duffy Binding Protein » de *P. vivax* (29) ou EBA-175 de *P. falciparum* (30) et (31) dont une région est spécifiquement riche en cystéine), sous réserve que ne soit pas altérée, au contraire amplifiée, sa capacité d'inhiber une parasitémie normalement introduite in vivo par le parasite correspondant.

Le fragment codant pour la p19 ou une partie de celle-ci, peut contenir également, en amont de l'extrémité N-terminale de p19, une séquence peptidique encore différente, par exemple à un fragment C-terminal du peptide signal utilisé, tel que celui de la protéine MSP-1. Cette séquence comprend de préférence moins de 50 acides aminés, par exemple de 10 à 35 acides aminés.

Ces observations s'étendent de la même façon à des p19 issues d'autres *Plasmodium*, en particulier *P. falciparum*, l'espèce dominante des parasites, responsable d'une des formes les plus graves de paludisme.

Mais les techniques rappelées ci-dessus pour la production dans un système de baculovirus d'une p19 recombinante issue de *P. vivax* ou *P. cynomolgi* sont difficilement transposables telles quelles à la production d'une p19 recombinante de *P. falciparum* avec un rendement satisfaisant, ne fût-ce que pour obtenir des quantités appréciables autorisant la réalisation d'essais d'immunoprotection.

L'invention fournit également un procédé remédiant en grande partie à cette difficulté. Il devient aussi possible d'obtenir des rendements beaucoup plus importants en p19 de *P.falciparum* -et d'autres *Plasmodiums* lorsque l'on rencontre des difficultés semblables- en mettant en oeuvre une séquence nucléotidique synthétique de substitution à la séquence nucléotidique naturelle codant pour la p19 de *Plasmodium falciparum* dans un vecteur d'expression d'un système baculovirus, cette séquence nucléotidique synthétique codant pour la même p19, mais étant caractérisée par une proportion de nucléotides G et C plus élevée que dans la séquence nucléotidique naturelle.

En d'autres termes, l'invention découle de la découverte que l'expression dans un système baculovirus d'une séquence nucléotidique codant pour une p19, était apparemment liée à une compatibilité améliorée des codons successifs de la séquence nucléotidique à exprimer avec la « machinerie cellulaire » des cellules hôtes transformables par des baculovirus, à l'instar de ce qui est observé pour les séquences nucléotidiques naturelles normalement contenues dans ces baculovirus et exprimées dans les cellules hôtes infectées ; d'où la mauvaise expression, sinon parfois l'absence totale d'expression d'une séquence nucléotidique native de *P.falciparum* ; d'où également une explication possible à l'expression plus efficace observée de la p19 de *P.vivax* dans un système baculovirus par Longacre et al. (14) et, comme les inventeurs l'ont aussi constaté, de la séquence de *P.cynomolgi* à partir des séquences nucléotidiques p19 natives correspondantes, en raison de leurs teneurs relatives en nucléotides G et C beaucoup plus élevées que celles des séquences nucléotidiques natives codant pour les p19 de *P.falciparum*.

L'invention concerne donc aussi, plus généralement, un vecteur modifié du type baculovirus recombinant contenant sous le contrôle d'un promoteur contenu dans ce vecteur et susceptible d'être reconnu par des cellules transfectables par ce vecteur, une première séquence nucléotidique codant pour un peptide signal exploitable par un système

baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence nucléotidique en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et code pour la séquence peptidique :

- 5 • soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* autre que *Plasmodium vivax* et infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
 - 10 • soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est ~~apte aussi à inhiber une parasitémie normalement induite in vivo par le~~ *capable d'induire une réponse immunitaire capable d'* ~~par le~~ *due au* parasite correspondant ;
 - 15 • soit d'un peptide immunologiquement équivalent dérivé du susdit fragment peptidique C-terminal (p19) ou de la susdite partie de fragment peptidique par addition, délétion ou substitution d'acides aminés n'entraînant pas une modification importante de la capacité de ce peptide immunologiquement équivalent à induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale semblable à celle
 - 20 produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et
- ladite séquence nucléotidique ayant le cas échéant une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% de la totalité des nucléotides dont elle est constituée. Cette séquence
- 25 peut être obtenue par construction d'un gène synthétique dans lequel les codons naturels ont été changés par des codons riches en G/C sans que leur traduction soit modifiée (maintien de la séquence peptidique).

En l'occurrence ladite séquence nucléotidique, fournie par un ADN synthétique, peut présenter au moins 10% de codons modifiés par rapport

- 30 à la séquence du gène ou du cDNA naturel tout en conservant les

caractéristiques de la séquence naturelle traduite, c'est-à-dire le maintien de la séquence en amino-acides.

Cela étant, on n'exclut pas que cette teneur en nucléotides G et C pourrait être davantage accrue, dès lors que les modifications qui en résulteraient quant à la séquence en acides aminés du peptide recombinant -ou peptide immunologiquement équivalent-produit n'entraîneraient pas une perte des propriétés immunologiques, voire protectrices, des protéines recombinantes formées, notamment dans les essais qui seront illustrés plus loin.

Ces observations s'appliquent naturellement à d'autres *Plasmodium* infectieux pour l'homme, en particulier dès lors que des séquences nucléotidiques natives codant pour les p19 correspondantes, auraient des teneurs en nucléotides T et A difficilement compatibles avec une expression efficace dans un système baculovirus.

La séquence codant pour le signal utilisé peut être celle normalement associée à la séquence native du *Plasmodium* concerné. Mais elle peut également être issue d'un autre *Plasmodium*, par exemple *P.vivax* ou *P.cynomolgi* ou d'un autre organisme s'il est susceptible d'être reconnu en tant que signal dans un système baculovirus.

La séquence codant pour la p19 ou un fragment de celle-ci au sein du vecteur considéré est, le cas échéant, dépourvue de la séquence d'ancrage de la protéine native au parasite dont elle est issue, cas dans lequel la protéine exprimée est en général excrétée dans le milieu de culture (forme soluble). Il est d'ailleurs remarquable à cet égard que dans les conditions de l'invention, les formes solubles et ancrées de protéines recombinantes produites, en particulier lorsqu'elles sont issues de *P.falciparum* ou *P.cynomolgi* ou *P.vivax*, ont tendance à former des oligomères, cette propriété pouvant être à l'origine des immunogénicités accrues des protéines recombinantes formées.

L'invention concerne tout autant les vecteurs dans lesquels la séquence codante contient la séquence d'extrémité 3' terminale codant

pour la séquence d'extrémité C'-terminale hydrophobe de la p19 et qui est normalement impliquée dans l'induction de l'ancrage de la protéine native à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée. Cette région d'extrémité 3'-terminale peut d'ailleurs être hétérologue vis-à-vis de la séquence codant pour la partie soluble de p19, par exemple correspondre à la séquence 3'-terminale issue de *P.vivax* ou d'un autre organisme dès lors qu'elle code pour une séquence d'ancrage de l'ensemble de la protéine recombinante produite à la membrane de l'hôte cellulaire du système baculovirus mis en oeuvre. A titre d'exemple de telles séquences d'ancrage on cite la GPI de l'antigène CD59 exprimable dans des cellules d'insectes du type *Spodoptera frugiperda* (32) ou la GPI d'une protéine humaine CD14 (33).

L'invention concerne naturellement aussi les protéines recombinantes, ces protéines comportant des épitopes conformationnels reconnus par des sérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

D'une façon générale, l'invention concerne également toute protéine recombinante du type indiqué ci-dessus, dès lors qu'elle comporte des épitopes conformationnels tels que produits dans le système baculovirus, notamment ceux qui se trouvent être instables en milieu réducteur.

L'invention concerne naturellement lesdites protéines recombinantes, qu'elles soient sous la forme dite soluble ou sous la forme pourvue d'une région d'ancrage, en particulier aux hôtes cellulaires mis en oeuvre dans le système baculovirus.

Entrent également dans le champ de l'invention, les oligomères produits spontanément dans les systèmes baculovirus utilisés ou produits a posteriori, en ayant recours à des techniques classiques d'oligomérisation de protéines. La technique couramment utilisée met en oeuvre le glutaraldéhyde. Mais tout système classique de pontage entre des fonctions respectivement amine et carboxyle, telles qu'on les retrouvent dans les protéines pourra également être utilisé. A titre

d'exemples, on peut mettre en oeuvre l'une quelconque des techniques décrites dans la demande de brevet européen 0602079.

5 Par « oligomère » on entend une molécule contenant de 2 à 50 unités monomère, chacune de ces unités monomère contenant la p19 ou un fragment de celle-ci, tel que défini ci-dessus, capable de former un agrégat. L'invention porte également sur tout produit de conjugaison entre une p19 ou fragment de p19 tel que défini ci-dessus, d'une part, et une molécule porteuse –par exemple une polylysine-alanine– utilisable pour la production des vaccins, d'autre part, par l'intermédiaire de liaisons
10 covalentes ou non. Les compositions vaccinales les mettant en oeuvre font également partie de l'invention.

L'invention concerne également les compositions de vaccins mettant en oeuvre ces protéines recombinantes oligomères ou conjugués, y inclus d'ailleurs les protéines issues de *Plasmodium vivax*, ces observations
15 s'étendant également aux oligomères de ces protéines recombinantes.

Font également partie de l'invention les compositions dans lesquelles les protéines recombinantes susmentionnées sont associées à un adjuvant, par exemple un alun. Les protéines recombinantes comportant l'extrême région C-terminale permettant leur ancrage à la
20 membrane des cellules dans lesquelles elles sont produites sont avantageusement utilisées en combinaison avec des lipides aptes à former des liposomes et appropriés à la production de vaccins. Sans qu'il y ait eu lieu de s'y limiter, on peut avoir recours aux lipides décrits à cet effet par exemple dans l'ouvrage intitulé « Les liposomes aspects technologique,
25 biologique et pharmacologique » de J. Delattre et al., édition INSERM, 1993.

La présence de la région d'ancrage dans la protéine recombinante, qu'il s'agisse d'une région d'ancrage homologue ou hétérologue vis-à-vis de la partie vaccinale proprement dite, est de nature à favoriser la
30 production d'anticorps cytophiles, notamment du type IgG_{2a} et IgG_{2b} chez la souris qui pourraient avoir une activité protectrice particulièrement élevée,

au point que l'on pourrait se dispenser d'associer les principes actifs de vaccins ainsi constitués avec des adjuvants autres que les lipides utilisés pour la constitution des formes liposomiques. Il s'agirait là d'un avantage important, puisque les liposomes peuvent être lyophilisés dans des conditions permettant leur stockage et leur transport, sans que des chaînes de froid ne soient alors indispensables.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront encore au cours de la description qui suit d'exemples de protéines recombinantes entrant dans le cadre de l'invention et des conditions dans lesquelles elles peuvent être produites, sans que ces exemples soient de nature à limiter la portée de l'invention.

Description de la construction PfMSP1_{p19}S (soluble) (p19 soluble issue de *P.falciparum*)

La construction recombinante PfMSP1_{p19}S contient de l'ADN correspondant aux 8 paires de base de la séquence leader et les 32 premiers acides aminés de MSP1 de *Plasmodium vivax* de Met₁ à Asp₃₂ (isolat Belem ; Del Portillo et al. 1991. P.N.A.S. 88, 4030.) suivis par un GluPhe, dû au site EcoR1 faisant la liaison des deux fragments. Le tout est suivi par le gène synthétique, décrit dans Figure 1, codant le *Plasmodium falciparum* MSP1_{p19} de Asn₁₆₁₃ à Ser₁₇₀₅ (isolat Uganda-Palo Alto ; Chang et al. 1988. Exp. Parasitol. 67,1). La construction est terminée par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est sécrétée dans le surnageant de culture des cellules infectées.

De la même façon et à des fins de comparaisons, on a produit une construction recombinante dans des conditions semblables à celles utilisées pour la production de la p19 ci-dessus, mais en travaillant avec une séquence codante consistant en une copie directe de l'ADN correspondant de la souche *P.falciparum* (FUP) décrite par Chang et al., Exp. Parasit. 67,1; 1989. La copie de ce gène naturel (s'étendant de

l'asparagine 1613 à la sérine 1705) a été formée par PCR à partir du gène natif.

On a représenté dans la **Figure 1A** les séquences à la fois du gène synthétique (Bac19) et du « gène natif » (PF19).

On remarque que 57 codons sur les 93 codons de la séquence codante native pour la p19 issue de *P.falciparum* ont été modifiés (pour ce qui est du troisième nucléotide dans 55 d'entre eux et du premier et troisième nucléotides dans les deux codons restant). Des codons nouveaux ont été ajoutés à l'extrémité 5' pour introduire le peptide signal dans les conditions qui ont été indiquées ci-dessus et pour introduire un site EcoRI pour le clonage, d'une part, et de même ont été ajoutés deux codons stop non présents dans la p19 de *P.falciparum* aux fins d'obtenir des signaux de terminaison de l'expression. Les lettres individualisées placées respectivement au dessus des codons successifs correspondent aux acides aminés respectifs successifs. Les astérisques (*) se rapportent aux codons stop. Les lignes verticales soulignent les nucléotides qui sont les mêmes dans les deux séquences.

20 **Description de la construction PfMSP1_{p19}A (ancré GPI) (p19 ancrée de *P.falciparum*)**

La construction PfMSP1_{p19}A a des caractéristiques de la précédente sauf que la séquence synthétique (**Figure 1B**) code pour le MSP1_{p19} de *Plasmodium falciparum* (isolat Uganda-Palo alto) de Asn₁₆₁₃ à Ile₁₇₂₆ suivie par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est ancrée dans la membrane plasmique des cellules infectées par une structure du type glycosyl phosphatidyl inositol (GPI).

30 La **figure 1C** est représentative de la séquence de la protéine recombinante PfMSP1_{p19}S avant coupure de la séquence signal.

La figure 1D est représentative de la séquence de la protéine recombinante PfMSP1_{p19}S après coupure de la séquence signal.

5 Les acides aminés soulignés dans les figures 1C et 1D proviennent du site EcoR1 utilisé pour joindre les séquences nucléotidiques dérivées de la partie N-terminale de MSP1 de *P.vivax* (avec séquence signal) et de MSP1_{p19} de *P.falciparum*.

10 ~~Figure 2 - L'antigène recombinant PfMSP1_{p19} soluble purifié par~~
immunoaffinité a été analysé par immunoblot après SDS-PAGE en présence (réduit) ou absence (non réduit) de B-mercaptoéthanol. Les échantillons sont chargés sur gel après chauffage à 95°C en présence de 2% SDS. Dans ces conditions seulement des liaisons du type covalent (ponts disulfure) peuvent résister à la désagrégation. Le blot de gauche a
15 été révélé avec un anticorps monoclonal qui réagit avec un épitope linéaire de la p19 naturelle. Le blot de droite a été révélé avec un mélange de 13 antisera humains provenant des sujets avec une immunité acquise au paludisme dû à *Plasmodium falciparum*. Ces résultats montrent que la molécule recombinante de baculovirus reproduit bien les épitopes
20 conformationnels en forme de polymère qui sont reconnus en majorité par l'antiserum humain.

25 **Figure 3 - L'antigène recombinant PvMSP1_{p42} soluble** (Longacre et al. 1994, op.cit.) a été incubé pendant 5 heures à 37° en présence des fractions de protéines dérivées des mérozoïtes de *P.falciparum* et séparées par isoélectrofocalisation. Par la suite les échantillons ont été analysés par immunoblot en présence (réduit) ou absence (non réduit) de B-mercaptoéthanol. Les fractions 5 à 12 d'isoélectrofocalisation, ainsi que deux extraits totaux de mérozoïtes faits en présence (Tex) ou absence (T)
30 de détergent ont été analysés. L'immunoblot a été révélé avec des anticorps monoclonaux spécifiques pour le MSP1_{p42} et p19 de *P.vivax*. Les

résultats suggèrent qu'il y a une activité protéolytique dans les mérozoïtes de *P.falciparum* qui peut être extraite en détergent. La digestion du p42 dans certaines fractions semble provoquer une polymérisation des produits de digestion (p19); cette polymérisation est probablement liée à la formation de ponts disulfure puisqu'en présence de B-mercaptoéthanol, les formes de haut poids moléculaire disparaissent en faveur d'une molécule d'environ 19 kDa (Tex-R). La polymérisation du p19 observée dans ces expériences pourrait donc être une propriété intrinsèque de cette molécule *in-vivo*.

10

Description de la construction PcMSP1_{p19}S (soluble) (p19 soluble de *P.cynomolgi*)

L'ADN utilisé pour la construction susdite a été obtenu à partir d'un clone de la souche de *Plasmodium cynomolgi ceylonensis* (22-23). Cette souche a été maintenue par des passages successifs dans son hôte naturel (*Macaca sinica*) et des transmissions cycliques par l'intermédiaire de moustiques (27).

Des parasites sanguins ont été obtenus à partir des singes infectés au stade schizonte mature quand les parasitémies ont atteint un niveau de 5%. Ils ont alors été purifiés selon la méthodes décrites dans (25). L'ADN a ensuite été extrait comme décrit dans (26).

Un fragment de 1200 paires de base a ensuite été produit en ayant recours à la réaction PCR mettant en oeuvre les oligonucléotides soulignés dans la **Figure 4** et issus de *P.vivax*. L'oligonucléotide 5' comprenait un site de restriction EcoRI et l'oligonucléotide 3' deux codons synthétiques stop TAA suivis d'un site de restriction BglII. Ce fragment a été introduit par ligation et par l'intermédiaire de ces sites EcoRI et BglII dans le plasmide pVLSV₂₀₀ contenant déjà la séquence signal de la protéine MSP-1 de *P.vivax* (19). Le nouveau plasmide (pVLSV₂₀₀C₄₂) a été utilisé pour l'analyse de séquences d'ADN.

Les séquences de *P.cynomolgi* et des séquences correspondantes de *P.vivax* ont été mises en alignement. Les flèches noires désignent les sites de clivage primaire et secondaire présumés. Ils ont été déterminés par analogie avec les sites connus dans *P.falciparum* (27, 28). Des lignes verticales et des flèches horizontales localisent les limites des quatre régions qui ont été étudiées. La région 4 correspond à la séquence codant pour la p19 de *P.cynomolgi*. Des sites de glycosylation sont encadrés et les cystéines conservées sont soulignées. Dans la partie inférieure de la **Figure 4** sont indiqués les pourcentages identité entre les deux isolats de *P.vivax* et *P.cynomolgi*.

La construction recombinante PcMSP1_{p19}S contient de l'ADN correspondant aux 8 paires de bases de la séquence « leader » et les 32 premiers acides aminés de MSP1 de *Plasmodium vivax* de Met₁ à Asp₃₂ (isolat Belem ; Del Portillo et al. 1991. P.N.A.S. 88, 4030.) suivis par un GluPhe, dû au site EcoR1 faisant la liaison des deux fragments. Le tout est suivi par la séquence codant pour le MSP1_{p19} de *Plasmodium cynomolgi* (souche Ceylon) de Lys₂₇₆ à Ser₃₈₀. La construction est terminée par deux codons stop de TAA. Cette construction donne lieu à une protéine recombinante qui est sécrétée dans le surnageant de culture des cellules infectées.

Purification de la protéine recombinante PfMSP1p19 par chromatographie d'immunoaffinité avec un anticorps monoclonal reconnaissant spécifiquement la p19 de *Plasmodium falciparum*.

La résine de chromatographie a été préparée en liant 70 mg d'un anticorps monoclonal à 3g de CNBr-Sepharose 4B activé (Pharmacia) par des méthodes standards détaillées dans le mode d'emploi fourni par Pharmacia. Les surnageants de culture contenant le PfMSP1p19 soluble ont été incubés en batch avec la résine de chromatographie pendant 16 heures à 4°C. La colonne a été lavée une fois avec 20 volumes de 0.05% NP40, 0.5M NaCl, PBS ; une fois avec 5 volumes de PBS et une fois avec

2 volumes de 10 mM phosphate de sodium, pH 6.8. L'élution a été effectuée avec 30 ml de 0.2 M glycine, pH 2.2. L'éluat a été neutralisé avec 1 M phosphate de sodium, pH 7.7 puis concentré par ultrafiltration et dialysé contre du PBS. Pour la purification du PfMSP1p19 ancré, toutes les solutions de lavage et élution contenaient en supplément 0.1% 3- (Dimethyl-dodecylammonio)-propane sulfonate (Fluka).

Essai de vaccination de MSP1 recombinant de *Plasmodium vivax* (p42 et p19) chez le singe écureuil *Saimiri sciureus*.

Cet essai de vaccination a été fait chez des *Saimiri sciureus boliviensis* mâles de 2 à 3 ans, non splénectomisés. Trois singes ont été injectés 3 fois par voie intramusculaire à 3 semaines d'intervalle avec un mélange d'environ 50 à 100 µg chacun, de PvMSP1_{p42} et _{p19} soluble recombinant (19), purifié par immunoaffinité. L'adjuvant de Freund complet et incomplet était utilisé comme suit : 1^{ère} injection : 1:1 FCA/FIA ; 2^{ème} injection 1:4 FCA/FIA ; 3^{ème} injection : FIA. Ces compositions d'adjuvant étaient mélangées par la suite 1:1 avec l'antigène en PBS. Les cinq singes contrôles recevaient l'antigène glutathione-S-transferase (GST) produit dans *E.coli* selon le même protocole. L'infection d'épreuve était effectuée en injectant 2.10^6 hématies infectées avec une souche adaptée de *Plasmodium vivax* (Belem) 2.5 semaines après la dernière injection. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez tous les animaux par examen des frottis colorés avec giemsa.

Les courbes de la **Figure 5** sont représentatives de la variation de la parasitémie mesurée en nombre d'hématies parasitées par microlitre de sang (sur l'axe des ordonnées à l'échelle logarithmique) en fonction du temps écoulé après l'infection (en jours). La courbe A correspond aux valeurs moyennes observées chez les trois singes vaccinés, la courbe B ; les valeurs moyennes chez cinq singes témoins.

De l'examen de la figure découle une très forte réduction de la parasitémie sous l'effet de la vaccination.

Essai de vaccination de MSP1 recombinant d *Plasmodium cynomolgi* (p42 et p19) chez le singe toque, *Macaca sinica*.

Quinze singes capturés ont été utilisés comme suit : (1) 3 animaux injectés avec 100 µg PcMSP1_{p42} soluble ; 3 animaux injectés avec 35 µg (1^{ère} injection) ou 50 µg (2^{ème} et 3^{ème} injections) PcMSP1_{p19} soluble ; (3) 3 animaux injectés avec un mélange de PcMSP1_{p42} et p19 ; (4) 3 animaux injectés avec l'adjuvant plus PBS ; (5) 3 animaux non injectés. L'adjuvant de Freund complet et incomplet a été utilisé selon le protocole décrit ci-dessus. Les injections ont été faites par voie intramusculaire à 4 semaines d'intervalle. L'infection d'épreuve était faite en injectant 2.10^5 hématies infectées avec *Plasmodium cynomolgi* 4 semaines après la dernière injection. La protection a été évaluée en déterminant les parasitémies journalières chez tous les animaux en examinant les parasitémies avec giemsa. Les parasitémies ont été classées comme négatives uniquement après comptage de 400 champs de frottis. Les parasitémies sont exprimées en pourcentage d'hématies parasitées.

Les Figures 6A-6F sont illustratives des résultats obtenus. Dans chacune d'elles apparaissent les parasitémies (exprimées en pourcentages d'hématies parasitées sur l'axe des ordonnées à l'échelle logarithmique) observées chez les animaux d'épreuve en fonction des temps après l'infection (en jours sur les axes des abscisses).

Les résultats concernent :

- dans la figure 6A ; des animaux contrôles non vaccinés ;
- la figure 6B concerne des animaux qui avaient reçu une solution saline contenant en outre l'adjuvant de Freund ;
- la figure 6C est une superposition des figures 6A et 6B, dans le but de faire apparaître les résultats relatifs résultant de l'administration de l'adjuvant de Freund aux animaux (les variations ne sont évidemment pas significatives) ;

- la **figur 6D** fournit les résultats obtenus à l'issue d'une vaccination avec la p42 ;
- la **figure 6E** concerne des animaux vaccinés avec la seule p19 ;
- enfin, la **figure 6F** concerne les animaux vaccinés avec un mélange de p19 et p42.

La p42 induit certes un certain niveau de protection. Mais comme en témoignent les figures 6E et 6F, la protection conférée par la p19 recombinante selon l'invention est considérablement améliorée.

On peut formuler l'hypothèse que l'amélioration de la protection résulte d'un clivage secondaire de la p42 qui s'accompagne du dévoilement de cystéine libre qui forme, par la suite, des ponts disulfure intermoléculaires donnant lieu à des multimères du p19 très caractéristiques de cette forme dans les protéines recombinantes des trois espèces testées.

Essai de vaccination avec une p19 recombinante de *Plasmodium falciparum* chez le singe écureuil.

Des singes élevés en captivité ont été injectés avec 1 ml d'inoculum par voie intramusculaire 2 fois à 4 semaines d'intervalle comme suit : **(1)** 4 animaux injectés avec 50 µg de PfMSP1p19 soluble en présence d'adjuvant de Freund comme suit: 1^{ère} injection 1:1 FCA/FIA; 2^{ème} injection 1:4 FCA/FIA; et mélangés par la suite 1:1 avec l'antigène en PBS; **(2)** 4 animaux injectés avec 50 µg de PfMSP1p19 soluble en présence de 10 mg d'alun; **(3)** 4 animaux injectés avec environ 50 µg de PfMSP1p19 ancré GPI reconstitués en liposomes composés 1:1 en molarité de cholestérol et phosphatidyl choline. Les animaux ont été saignés 17 jours après la deuxième injection.

Les globules rouges provenant d'un singe écureuil avec 30% de parasitémie due à *P. falciparum* (avec des formes mûres en majorité) ont été lavés en PBS et le culot était dilué 8 fois en présence de 2% SDS et

2% dithiothreitol et chauffé à 95° avant d'être chargé sur un gel de polyacrylamide de 7.5% (gel de séparation) et 4% (gel de stacking) (haut du gel). Après transfère en nitrocellulose l'analyse par immunoblot (immunoempreinte) a été fait avec des antisera comme suit: (1) pool d'antisera des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 soluble en adjuvant de Freund dilué au vingtième ; (2) pool d'antisera des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 soluble en adjuvant alun dilué au vingtième ; (3) pool d'antisera des 4 singes vaccinés avec PfMSP1p19 ancré en liposomes dilué au vingtième ; (4) l'anticorps monoclonal, qui réagit avec un épitope linéaire de PfMSP1p19, à 50 µg/ml ; (5) pool d'antisera SHI90 provenant d'un vingtaine de singes infectés à répétition par *P. falciparum* et devenus réfractaires à toute infection ultérieure de *P. falciparum*, dilué au cinq centième ; (6) pool d'antisera des singes naïfs (n'ayant jamais été exposés à *P. falciparum*) dilué au vingtième.

Les résultats montrent que les 3 pools d'antisera des singes vaccinés avec le PfMSP1p19 réagissent de façon importante et spécifique avec des complexes de très haut poids moléculaire (se trouvant de façon diffuse dans le gel de stacking) et présents dans des extraits de parasite contenant davantage de formes mûres. Ces résultats confortent l'hypothèse de la présence d'une agrégation spécifique du MSP1p19 *in vivo* comportant des épitopes qui sont reproduits dans les molécules recombinantes PfMSP1p19 synthétisées dans le système baculovirus, en particulier celles en forme d'oligomère.

La figure 7 illustre également ces résultats. Elle se rapporte aux immunoempreintes produites sur gel. Les trois premières colonnes du gel illustrent la réponse *in vivo* de singes à des injections de p19 [(1) avec l'adjuvant de Freund, (2) avec de l'alun, (3) sous forme de liposome] et notamment l'existence de complexes de haut poids moléculaire confortant l'hypothèse de l'agrégation *in vivo* de p19 sous forme d'oligomère, spécifique du stade de maturation (quand p42 est coupé en p19 et p33).

Cet essai de vaccination comprend également une troisième injection identique aux précédentes. L'injection avec l'adjuvant de Freund comprend uniquement du FIA.

Il y a deux animaux contrôles pour chaque groupe à savoir : 2 animaux contrôles injectés avec PBS et l'adjuvant de Freund ; 2 animaux contrôles injectés avec PBS et alun ; 2 animaux contrôles injectés avec liposomes sans protéine ; et deux animaux injectés avec PBS sans adjuvant. La protection est évaluée comme décrit ci-dessus.

L'invention concerne naturellement d'autres applications, par exemple celles exposées ci-après en rapport avec certains des exemples, lesquels ne présentent aucun caractère limitatif.

Thérapeutique

La molécule recombinante PfMSP1p19 peut être utilisée pour produire des anticorps spécifiques éventuellement utilisables par transfert passif dans un but de thérapeutique adaptée au paludisme sévère dû à *P. falciparum* avec risque de mortalité.

Diagnostic

Les molécules recombinantes PfMSP1p19 dérivées de baculovirus peuvent et ont été utilisées pour produire des anticorps monoclonaux spécifiques murins. Ces anticorps, en combinaison avec des antisera polyclonaux anti MSP1p19 provenant d'une autre espèce telle que le lapin ou la chèvre, peuvent être à la base d'un test de diagnostic semi-quantitatif pour le paludisme et capable de distinguer entre un paludisme dû à *P. falciparum*, qui peut être mortel, et un paludisme dû à *P. vivax*, qui n'est généralement pas mortel. Le principe de ce test serait de piéger et quantifier toute molécule de MSP1 contenant la partie p19 dans le sang.

Dans ce cadre, les avantages de la molécule MSP1p19 sont les suivants:

(i) elle est à la fois extrêmement bien conservée au sein d'une même espèce et suffisamment divergente entre des espèces différentes

pour permettre de produire facilement des réactifs spécifiques d'espèce. Aucune réaction croisée n'a été observée entre les anticorps dérivés de PfMSP1p19 et PvMSP1p19 ;

5 (ii) la fonction du MSP1p19, bien que non connue avec précision, semble être suffisamment importante pour que cette molécule ne varie pas de façon significative ou soit délétée sans effet létal pour le parasite ;

(iii) c'est un antigène majeur se trouvant sur tous les mérozoïtes et donc, il doit être, en principe, détectable même à basse parasitémie et proportionnellement à la parasitémie ;

10 (iv) puisque les molécules recombinantes de MSP1p19 dérivées de baculovirus semblent reproduire davantage la structure native de MSP1p19, les anticorps produits contre ces protéines seraient bien adaptés à un usage diagnostique.

15 Les microorganismes identifiés ci-dessous ont été déposés suivant la règle 6.1. du Traité de Budapest à la date du 01 février 1996, sous les numéros suivants :

<u>Références d'identification</u>	<u>Numéros d'enregistrement</u>
PvMSP1p19A	I - 1659
20 PvMSP1p19S	I - 1660
PfMSP1p19A	I - 1661
PfMSP1p19S	I - 1662
PcMSP1p19S	I - 1663

25 L'invention concerne également l'utilisation de ces anticorps, alors de préférence préalablement fixés sur un support solide (par exemple pour chromatographie d'affinité), pour la purification de peptides du type p19 initialement contenus dans un mélange.

30 La purification fait alors intervenir une mise en contact de ce mélange avec l'anticorps, la dissociation du complexe antigène-anticorps et la récupération du peptide de type p19 purifié.

REFERENCES

- 5 (1) Holder, J.A. et al. (1982) « Biosynthesis and processing of a
Plasmodium falciparum schizont antigen recognized by immune serum
 and a monoclonal antibody ». J. Exp. Med. **156** :1528-1538.
- (2) Howard, R. et al. (1984) « Localization of the major *Plasmodium*
falciparum glycoprotein on the surface of mature intracellular
 trophozoites and schizonts ». Mol. Biochem. Parasitol. **11** : 349-362.
- 10 (3) Pirson, P. et al. (1985) « Characterization with monoclonal antibodies
 of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites ». J.
 Immunol. **134** : 1946-1951.
- (4) Aley, S.B. et al. (1987) « *Plasmodium vivax*: Exoerythrocytic schizonts
 recognized by monoclonal antibodies against blood-stage schizonts ».
 Exp. Parasitol. **64** : 188-194.
- 15 (5) Holder, A.A. (1988) « The precursor to major merozoite surface
 antigen: structure and role in immunity ». Prog. Allergy **41** : 72-97.
- (6) Cooper, J.A. (1993) « Merozoite surface antigen-1 of *Plasmodium* ».
 Parasitol. Today **9** : 50-54.
- 20 (7) Holder, A.A., et al. (1987) « Processing of the precursor to the major
 merozoite antigens of *Plasmodium falciparum* » Parasitology **94** : 199-
 208.
- 25 (8) Lyon, J.A. et al. (1986) « Epitope map and processing scheme for the
 195 000-dalton surface glycoprotein of *Plasmodium falciparum*
 merozoites deduced from cloned overlapping segments of the gene ».
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 2989-2993.
- 30 (9) Blackman, M.J. et al. (1992) « Secondary processing of the
Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (MSP1) by
 calcium-dependent membrane-bound serine protease: shedding of
 MSP1₃₃ as a noncovalently associated complex with other fragments of
 the MSOP1 ». Mol. Biochem. Parasitol. **50** : 307-316.

- (10) Haldar, K., et al. (1985) « Acylation of a *Plasmodium falciparum* merozoïte surface antigen via sn-1,2-diacyl glycerol. ». J. Biol. Chem. **260** : 4969-4974.
- 5 (11) Braun Breton, C. et al. (1990) « Glycolipid anchorage of *Plasmodium falciparum* surface antigens ». Res. Immunol. **141** : 743-755.
- (12) Kumar, S. et al. (1995) « Immunogenicity and *in vivo* Efficacy of Recombinant *Plasmodium falciparum* Merozoïte surface protein-1 in Aotus Monkeys ». Molecular Medicine, Vol. 1, 3 : 325-332.
- 10 ~~(14) Longacre, S. et al. (1994) « *Plasmodium vivax* merozoïte surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus ». Mol. Biochem. Parasitol. **64** : 191-205.~~
- (15) McBride, J.S. et al. (1987) « Fragments of the polymorphic Mr 185 000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoïtes form an antigenic complex ». Mol. Biochem. Parasitol. **23** : 71-84.
- 15 (16) Blackman, M.J. et al. (1990) « A single fragment of a malaria merozoïte surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies ». J. Exp. Med. **172** : 379-382.
- 20 (17) Kaslow, D.C. et al. (1994) « Expression and antigenicity of *Plasmodium falciparum* major merozoïte surface protein (MSP1₁₉) variants secreted from *Saccharomyces cerevisiae* ». Mol. biochem. Parasitol. **63** ; 283-289.
- (18) Chang, S.P., et al. (1992) « A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth ». J. Immunol. **149** : 548-555.
- 25 (19) Longacre, S. (1995) « The *Plasmodium cynomolgi* merozoïte surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other *Plasmodium* species ». Mol. Biochem. Parasitol. **74** :105-111.
- 30

- (20) Del Portillo, H.A., et al. (1990) « Primary structure of the merozoïte surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species ». Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88** : 4030-4034.
- 5 (21) Gibson, H.L., et al. (1992) « Structure and expression of the gene for Pv200, a major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax* ». Mol. biochem. Parasitol. **50** : 325-334.
- (22) Dissanaïke, A.S., et al. (1965) « Two new malaria parasites, *Plasmodium cynomolgi ceylonensis* sub sp. nov. and *Plasmodium*
 10 *fragile* sp. nov. from monkeys in Ceylon ». Ceylon Journal of Medical Science **14** : 1-9.
- (23) Cochrane, A.H., et al. (1986) « Further studies on the antigenic diversity of the circumsporozoïte proteins of the *Plasmodium cynomolgi* complex. ». Am. J. Trop. Med. Hyg. **35** : 479-487.
- 15 (24) Naotunne, T. de S., et al. (1990) « *Plasmodium cynomolgi*: serum-mediated blocking and enhancement of infectivity to mosquitos during infections in the natural host, *Macaca sinica* ». Exp. Parasitol. **71**, 305-313.
- (25) Ihalamulla, R.L. et al. (1987) « *Plasmodium vivax*: isolation of mature asexual stages and gametocytes from infected human blood by colloidal silica (Percoll) gradient centrifugation ». Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **81** : 25-28.
- 20 (26) Kimura, E., et al. (1990) « Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: high prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived in strains derived from malaria patients ». Gene **91** : 57-62.
- 25 (27) Heidrich, H.-G., et al. (1989) « The N-terminal amino acid sequences of the *Plasmodium falciparum* (FCBI) merozoïte surface antigen of 42 and 36 kilodalton, both derived from the 185-195 kilodalton precursor ». Mol. Biochem. Parasitol. **34** : 147-154.
- 30

- (28) Blackman, M.J., et al. (1991) « Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoïte surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains ». Mol. Biochem. Parasitol. **49** : 29-34.
- 5 (29) Adams, J.M. et al. (1992) « A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites ». Proc. Natl. Acad. Sci, **89**:7085-7089.
- (30) Sim B.K.L. (1995) « EBA-175: An erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium falciparum* ». Parasitology Today, vol.II, n°6:213-217.
- 10 ~~(31) Sim B.K.L. (1994) « Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum* ». Science, **264**:1941-1944.~~
- (32) Davies, A. et al. (1993), Biochem J. **295** (Pt3) : 889-896. « Expression of the glycosylphosphatidylinositol-linked complement-inhibiting protein CD59 antigen in insect cells using a baculovirus vector ».
- 15 (33) Haziot A. et al. (1994) J. Immunol. **152** : 5868. « Recombinant soluble CD14 Inhibits LPS-Induced Tumor Necrosis Factor & Production by Cells in Whole Blood ».

REVENDICATIONS

5 1. Protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, autre que *Plasmodium vivax*, et infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
 - soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
 - soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et
- cette protéine recombinante comportant le cas échéant des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

20 2. Protéine recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique C-terminale de la p33 (fragment N-terminal de 33 kDa) normalement du côté associé à la p19 dans la p42 correspondante, avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière séquence polypeptidique C-terminale de la p33 comportant, lorsqu'elle est présente, moins de 50 résidus d'acides aminés.

3. Protéine recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique du côté C-terminal de la p33 (fragment N-terminal de 33 kDa) normalement associée à la p19 dans la p42 correspondante avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière séquence polypeptidique C-terminale de la p33, comportant, lorsqu'elle est présente, moins de 35, voire même moins de 10 résidus d'acides aminés.

~~4. Protéine recombinante selon la revendication 1, caractérisée~~
 en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique du côté C-terminal de la p33 (fragment N-terminal de 33 kDa) normalement associée à la p19 dans la p42 correspondante avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière séquence polypeptidique C-terminale de la p33 étant limitée, lorsqu'elle est présente, à celle qui conserve un degré de conservation substantiel dans les *Plasmodium* infectieux pour l'homme, tels que *P.falciparum* ou *P.vivax*.

5. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la partie de fragment p19 contient au moins l'une des deux régions EGF normalement contenues dans cette p19.

6. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le poids moléculaire de ce fragment p19 ou de cette partie de fragment p19 est comprise entre 10 et 25 kDa, notamment entre 10 et 15 kDa.

7. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle comporte également un groupe glycosylphosphatidylinositol (GPI) du type de ceux qui permettent un ancrage du fragment p19 à l'hôte cellulaire, notamment une cellule eucaryote, préférentiellement une cellule d'insecte infectable par un baculovirus, dans lequel ladite protéine recombinante est exprimée.

8. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est dépourvue de la partie C-terminale extrême hydrophobe qui intervient dans l'induction de l'ancrage de cette protéine recombinante à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule eucaryote, préférentiellement une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

9. Protéine recombinante selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'elle est hydrosoluble.

10. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence de la p19 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium falciparum* ou ladite partie du fragment correspondant.

11. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle contient la séquence de la p19 de la protéine MSP-1 de *Plasmodium cynomolgi* ou ladite partie du fragment correspondant.

12. Oligomère de la protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

13. Oligomère selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il contient de 2 à 50 unités monomère de ladite séquence polypeptidique de la protéine recombinante telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 11.

14. Protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle est conjuguée à une molécule porteuse utilisable pour la production de vaccins.

15. Composition vaccinnante contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif une protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;

- soit d'une partie de ce fragment ^{induire une réponse immune capable d'} dès lors qu'elle est apte aussi à inhiber ^{due au} une parasitémie ~~normalement induite~~ in vivo ~~par le~~ parasite correspondant ;

- 10 • soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et
cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant la majorité
15 des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

- 16. Composition vaccinnante selon la revendication 15, caractérisée en ce que son principe actif consiste en une protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 2 à 11 ou 14, ou
20 en un oligomère selon la revendication 12 ou 13.

- 17. Composition vaccinnante contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif un oligomère d'une protéine recombinante selon la revendication 15 ou la revendication 16.

- 25 18. Anticorps polyclonal reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaît pas *Plasmodium vivax*.

- 30 19. Anticorps monoclonal selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il ne reconnaît pas *Plasmodium vivax*.

20. Anticorps monoclonal selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P.falciparum*.

21. Anticorps monoclonal selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P.vivax*.

5 22. Procédé de diagnostic différentiel permettant de distinguer entre une infection parasitaire due à *P.vivax*, d'une part, et une infection parasitaire due à un autre *Plasmodium*, d'autre part, caractérisé par les mises en contact d'un prélèvement biologique infecté par un *Plasmodium* avec un anticorps selon la revendication 21, d'une part, et avec un
10 anticorps selon la revendication 19 ou 20, d'autre part, et la détection selon le cas, de la production ou non d'une réaction immunologique.

23. Vecteur modifié du type baculovirus recombinant contenant sous le contrôle d'un promoteur contenu dans ce vecteur et susceptible d'être reconnu par des cellules transfectables par ce vecteur, une première
15 séquence nucléotidique codant pour un peptide signal compatible avec l'expression dans un système baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et dont au moins une partie code pour la séquence peptidique :

- 20 • soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* autre que *Plasmodium vivax* et infectieux pour l'homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- 25 • soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;

- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

ladite séquence nucléotidique ayant en outre une teneur en G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% de la totalité des nucléotides dont elle est constituée.

24. Vecteur modifié selon la revendication 23, caractérisé en ce que la susdite deuxième séquence polypeptidique est conforme à celle définie dans l'une quelconque des revendications 2 à 11.

10 25. Vecteur modifié selon la revendication 23, caractérisé en ce que la deuxième séquence nucléotidique est une séquence synthétique.

26. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 23 à 25, caractérisé en ce que la première séquence nucléotidique code pour un peptide signal issu de *Plasmodium vivax* et normalement associé à la protéine MSP-1 de ce *Plasmodium*.

27. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 23 à 26, caractérisé en ce que la deuxième séquence nucléotidique est dépourvue à son extrémité 3' terminale de la séquence d'extrémité C-terminale hydrophobe qui est impliquée dans l'induction de l'ancrage de cette protéine recombinante à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

28. Vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 23 à 27, caractérisé en ce qu'il consiste en un baculovirus modifié.

25 29. Organisme, notamment cellule d'insecte du type Sf9, transfectable et transfecté par le vecteur modifié selon l'une quelconque des revendications 23 à 27.

30. ADN synthétique contenant une première séquence nucléotidique dont au moins une partie code pour la séquence peptidique :

- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte *Plasmodium falciparum*, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;

- soit d'une partie de ce fragment peptidique, dès lors que le produit d'expression de cet ADN dans un système baculovirus est apte à ^{induire une réponse immunitaire capable d'}inhiber une parasitémie ~~normalement induite~~ in vivo ~~par le~~ parasite correspondant ; ^{due au}

- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et ladite séquence nucléotidique ayant en outre une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% du total des nucléotides dont est constitué le susdit ADN synthétique.

31. ADN synthétique selon la revendication 30, caractérisé en ce que sa première séquence nucléotidique est dépourvue à son extrémité 3' terminale de la séquence codant pour la région d'extrémité C-terminale hydrophobe normalement impliquée dans l'induction de l'ancrage de la protéine p19 à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

32. ADN synthétique selon la revendication 30 ou la revendication 31, caractérisé en ce que la première séquence nucléotidique est précédée d'une séquence nucléotidique signal codant pour un peptide signal normalement associé à une protéine MSP-1 de *Plasmodium*, homologue ou hétérologue vis-à-vis de la séquence principale.

33. ADN synthétique selon la revendication 32, caractérisé en ce que la séquence signal est issue de *P. vivax*.

34. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 30 à 33, caractérisé en ce que la susdite première séquence nucléotidique inclut une séquence 3'-terminale codant pour une région polypeptidique d'ancrage à la membrane cellulaire, ladite région d'ancrage se fixant sur la protéine recombinante exprimée à la surface de la membrane de l'hôte cellulaire transformé avec un vecteur contenant ledit ADN synthétique, ladite séquence 3' étant homologue à celle de la séquence nucléotidique principale, ou hétérologue, notamment celle issue de *P. vivax*.

35. ADN synthétique selon la revendication 34, caractérisé en ce que la séquence 3'-terminale est issue de *P. vivax*.

36. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 30 à 34, caractérisé en qu'il est dépourvu de ladite séquence 3'-terminale.

37. Vecteur de type baculovirus selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1659
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1660
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1661
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1662
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1663.

38. Hybridome sécréteur d'anticorps monoclonaux ayant les spécificités des anticorps selon l'une quelconque des revendications 18 à 21.

39. Procédé de séparation d'un peptide p19 de spécificité donnée à partir d'un mélange de peptides, caractérisé par la mise en contact de ce mélange de peptides avec un anticorps correspondant, conforme à l'une quelconque des revendications 18 à 21, de préférence préalablement fixé sur un support insoluble, par la dissociation ultérieure du composé antigène-anticorps formé et par la récupération du peptide p19 purifié.

40. Utilisation de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 ou de l'oligomère selon la revendication 13 ou 14 pour la préparation d'une composition immunogène susceptible d'induire une réponse immune contre une infection à *Plasmodium*.

**PROTEINE RECOMBINANTE CONTENANT UN FRAGMENT
C-TERMINAL DE LA PROTEINE MSP-1
D'UN *PLASMODIUM* INFECTIEUX POUR L'HOMME
POUR LA PRODUCTION DE VACCINS ANTI-PALUDIQUES**

5

L'invention concerne de nouveaux principes actifs de vaccins dérivés de la protéine majeure de surface de formes mérozoïtes d'un *Plasmodium* infectieux pour l'homme, plus généralement connue sous la désignation MSP-1.

10

Cette protéine a déjà fait l'objet d'études nombreuses. Elle est synthétisée dans le stade schizonte des parasites du type *Plasmodium*, notamment *Plasmodium falciparum*, et est exprimée sous forme de l'un des constituants majeurs de la surface des mérozoïtes aussi bien pendant le stade hépatique que pendant le stade érythrocytaire du paludisme (1, 2, 3, 4). En raison du caractère prédominant et de la conservation dans toutes les espèces de *Plasmodium* connues de cette protéine, il a été suggéré qu'elle pourrait représenter un candidat pour la constitution de vaccins anti-paludiques (5, 6).

15

Il en a encore été de même pour des fragments de cette protéine, particulièrement des produits naturels de clivage dont l'on observe la formation, par exemple au cours de l'invasion par le parasite des érythrocytes de l'hôte infecté. Parmi, ces produits de clivage, on relèvera le fragment C-terminal ayant un poids moléculaire de 42 kDa (7,8) qui est à son tour clivé une nouvelle fois en un fragment N-terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 33 kDa et en un fragment C-terminal ayant un poids moléculaire apparent conventionnel de 19 kDa (9) qui reste normalement fixé à la membrane du parasite au terme des modifications dont il est lui-même l'objet, par l'intermédiaire de groupes du type glycosylphosphatidylinositol (GPI) (10, 11).

20

25

30

- soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- soit d'un peptide immunologiquement équivalent à ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant, de préférence, la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

La présence de ces épitopes conformationnels pourrait jouer un rôle important dans l'efficacité protectrice du principe actif de vaccins. On les retrouve tout particulièrement dans les principes actifs présentant par ailleurs les autres caractéristiques définies ci-dessus, lorsqu'ils ont été produits dans un système vecteur baculovirus. S'il en est besoin, il est mentionné ci-après que par l'expression « système de vecteur baculovirus » on entend l'ensemble que constitue le vecteur type baculovirus lui-même et les lignées cellulaires, notamment cellules d'insectes transfectables par un baculovirus modifié par une séquence à transférer dans ces lignées cellulaires avec pour résultat l'expression de cette séquence transférée. Des exemples préférés de ces deux partenaires du système baculovirus, ont été décrits dans l'article de Longacre et al. (19). C'est le même système qui a été utilisé dans les exemples qui suivent. Il va naturellement de soi que des variants, tant du baculovirus que des cellules infectables par ce baculovirus peuvent être utilisés en lieu et place de celui qui a été choisi.

Le caractère instable en milieu réducteur de ces épitopes conformationnels peut être mis en évidence, notamment par le test décrit plus loin dans les exemples, notamment en présence de β -mercaptoéthanol.

De ce point de vue, la protéine recombinante produite par S. Longacre et al. (14) peut être mise en oeuvre dans de tels compositions.

baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence nucléotidique en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et code pour la séquence peptidique :

- 5 • soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* autre que *Plasmodium vivax* et infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
- 10 • soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
- 15 • soit d'un peptide immunologiquement équivalent dérivé du susdit fragment peptidique C-terminal (p19) ou de la susdite partie de fragment peptidique par addition, délétion ou substitution d'acides aminés n'entraînant pas une modification importante de la capacité de ce peptide immunologiquement équivalent à induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale semblable à celle
- 20 produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

ladite séquence nucléotidique ayant le cas échéant une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% de la totalité des nucléotides dont elle est constituée. Cette séquence

25 peut être obtenue par construction d'un gène synthétique dans lequel les codons naturels ont été changés par des codons riches en G/C sans que leur traduction soit modifiée (maintien de la séquence peptidique).

En l'occurrence ladite séquence nucléotidique, fournie par un ADN synthétique, peut présenter au moins 10% de codons modifiés par rapport

30 à la séquence du gène ou du cDNA naturel tout en conservant les

- (33) Hazirot A. et al. (1994) J. Immunol. 152 : 5868. « R combinant soluble CD14 Inhibits LPS-Induced Tumor Necrosis Factor & Production by Cells in Whole Blood ».
- (34) Chang, S.P. et al., (1988) « *Plasmodium falciparum* : gene structure and hydropathy profile of the major merozoite surface antigen (gp195) of the Uganda-Palo Alto isolate. Exp. Parasitol. 67 : 1-11.
- (35) Holder, A.S. et al. (1985) « Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites, Nature 317 : 270-273.

10 L'invention concerne également les hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaissant pas *Plasmodium vivax*.

15 En particulier, ces hybridomes sécrètent des anticorps monoclonaux qui reconnaissent pas la p19 de *Plasmodium vivax* et qui reconnaissent spécifiquement la p19 de *Plasmodium falciparum*.

L'invention concerne également un hybridome caractérisé en ce qu'il produit un anticorps spécifique qui reconnaît spécifiquement la p19 de *P.vivax*.

20

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, infectieux pour l'Homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
 - soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
-
- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et cette protéine recombinante comportant en outre des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.
- 16.** Composition vaccinnante selon la revendication 15, caractérisée en ce que son principe actif consiste en une protéine recombinante selon l'une quelconque des revendications 2 à 11 ou 14, ou en un oligomère selon la revendication 12 ou 13.
- 17.** Composition vaccinnante contre un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme, contenant à titre de principe actif un oligomère d'une protéine recombinante selon la revendication 15 ou la revendication 16.
- 18.** Anticorps reconnaissant sélectivement la p19 d'une protéine MSP-1 de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* infectieux pour l'homme autre que *Plasmodium vivax* et ne reconnaît pas *Plasmodium vivax*.
- 19.** Anticorps selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il est monoclonal.

20. Anticorps selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il est monoclonal et en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P. falciparum*.

5 21. Anticorps monoclonal selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il reconnaît spécifiquement la p19 de *P. vivax*.

22. Procédé de diagnostic différentiel permettant de distinguer entre une infection parasitaire due à *P. vivax*, d'une part, et une infection parasitaire due à un autre *Plasmodium*, d'autre part, caractérisé par les mises en contact d'un prélèvement biologique infecté par un *Plasmodium* avec un anticorps selon la revendication 21, d'une part, et avec un anticorps selon la revendication 19 ou 20, d'autre part, et la détection selon le cas, de la production ou non d'une réaction immunologique.

23. Vecteur modifié du type baculovirus recombinant contenant sous le contrôle d'un promoteur contenu dans ce vecteur et susceptible d'être reconnu par des cellules transfectables par ce vecteur, une première séquence nucléotidique codant pour un peptide signal compatible avec l'expression dans un système baculovirus, caractérisé par une deuxième séquence en aval de la première, également sous le contrôle de ce promoteur et dont au moins une partie code pour la séquence peptidique :

- 20
- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium* autre que *Plasmodium vivax* et infectieux pour l'homme, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;

25

 - soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de la deuxième séquence dans un système baculovirus est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;

- soit d'un fragment peptidique C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte *Plasmodium falciparum*, ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;
 - soit d'une partie de ce fragment peptidique dès lors que le produit d'expression de cet ADN dans un système baculovirus est apte à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;
-

- soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment peptidique p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et ladite séquence nucléotidique ayant en outre une teneur en nucléotides G et C comprise entre 40 et 60%, de préférence d'au moins 50% du total des nucléotides dont est constitué le susdit ADN synthétique.

31. ADN synthétique selon la revendication 30, caractérisé en ce que sa première séquence nucléotidique est dépourvue à son extrémité 3' terminale de la séquence codant pour la région d'extrémité C-terminale hydrophobe normalement impliquée dans l'induction de l'ancrage de la protéine p19 à la membrane cellulaire de l'hôte dans lequel elle est exprimée, notamment dans une cellule d'insecte infectable par un baculovirus.

32. ADN synthétique selon la revendication 30 ou la revendication 31, caractérisé en ce que la première séquence nucléotidique est précédée d'une séquence nucléotidique signal codant pour un peptide signal normalement associé à une protéine MSP-1 de *Plasmodium*, homologue ou hétérologue vis-à-vis de la séquence principale.

33. ADN synthétique selon la revendication 32, caractérisé en ce que la séquence signal est issue de *P. vivax*.

34. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 30 à 33, caractérisé en ce que la susdite première séquence nucléotidique inclut une séquence 3'-terminale codant pour une région polypeptidique d'ancrage à la membrane cellulaire, ladite région d'ancrage se fixant sur la protéine recombinante exprimée à la surface de la membrane de l'hôte cellulaire transformé avec un vecteur contenant ledit ADN synthétique, ladite séquence 3' étant homologue à celle de la séquence nucléotidique principale, ou hétérologue, notamment celle issue de *P.vivax*.

~~35. ADN synthétique selon la revendication 34, caractérisé en ce que la séquence 3'-terminale est issue de *P.vivax*.~~

36. ADN synthétique selon l'une quelconque des revendications 30 à 34, caractérisé en qu'il est dépourvu de ladite séquence 3'-terminale.

37. Vecteur de type baculovirus selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1659
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1660
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1661
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1662
- le virus déposé à la CNCM sous le numéro I-1663.

38. Hybridome sécréteur d'anticorps monoclonaux ayant les spécificités des anticorps selon l'une quelconque des revendications 19 à 21.

39. Procédé de séparation d'un peptide p19 de spécificité donnée à partir d'un mélange de peptides, caractérisé par la mise en contact de ce mélange de peptides avec un anticorps correspondant, conforme à l'une quelconque des revendications 18 à 21, de préférence préalablement fixé sur un support insoluble, par la dissociation ultérieure du composé antigène-anticorps formé et par la récupération du peptide p19 purifié.

REVENDICATIONS

5 1. Protéine recombinante dont la séquence polypeptidique constitutive essentielle est celle :

- soit d'un fragment C-terminal de 19 kilodaltons (p19) de la protéine 1 de surface (protéine MSP-1) de la forme mérozoïte d'un parasite du type *Plasmodium*, autre que *Plasmodium vivax*, et infectieux pour l'Homme,

10 ce fragment C-terminal restant normalement ancré à la surface du parasite au terme de sa phase de pénétration dans des érythrocytes humains, à l'occasion d'un cycle infectieux ;

- soit d'une partie de ce fragment dès lors qu'elle est apte aussi à induire une réponse immune capable d'inhiber une parasitémie in vivo due au parasite correspondant ;

- 15 • soit d'un peptide capable d'induire une réponse immunologique de type cellulaire et/ou humorale équivalente à celle produite par ce fragment p19 ou à la susdite partie de ce fragment, et

20 cette protéine recombinante comportant des épitopes conformationnels instables en milieu réducteur et constituant, de préférence, la majorité des épitopes reconnus par des antisérums humains formés contre le *Plasmodium* correspondant.

2. Protéine recombinante selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est essentiellement dépourvue de toute séquence polypeptidique normalement en amont de la séquence polypeptidique C-terminale de la p33 (fragment N-terminal de 33 kDa) normalement du côté associé à la p19 dans la p42 correspondante, avant le clivage naturel de cette dernière, cette dernière séquence polypeptidique C-terminale de la p33 comportant, lorsqu'elle est présente, moins de 50 résidus d'acides aminés.

25

30

Bac 19	E	F	N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N
	GAA	TTC	AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC
PF 19																	
	AAC	ATT	TCA	CAA	CAC	CAA	TGC	GTA	AAA	AAA	CAA	TGT	CCA	GAA	AAT		
Bac 19	S	G	C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L
	TCT	GGC	TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG
PF 19																	
	TCT	GGA	TGT	TTC	AGA	CAT	TTA	GAT	GAA	AGA	GAA	GAA	TGT	AAA	TGT	TTA	TTA
Bac 19	N	Y	K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C
	AAC	TAC	AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	AGC	TGT
PF 19																	
	AAT	TAC	AAA	CAA	GAA	GGT	GAT	AAA	TGT	GTT	GAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	TGT
Bac 19	N	E	N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D
	AAC	GAG	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC
PF 19																	
	AAC	GAA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	GAT	GCA	GAT	GCC	AAA	TGT	ACC	GAA	GAA	GAT
Bac 19	S	G	S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S
	TCG	GGC	AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG
PF 19																	
	TCA	GGT	AGC	AAC	GGA	AAG	AAA	ATC	ACA	TGT	GAA	TGT	ACT	AAA	CCT	GAT	TCT
Bac 19	Y	P	L	F	D	G	I	F	C	S	*	*					
	TAC	CCG	CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA					
PF 19																	
	TAT	CCA	CTT	TTC	GAT	GGT	ATT	TTC	TGC	AGT							

Fig. 1A

Fig. 1B

	E	F	N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N
Bac 19	<u>GAA TTC</u>	AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC	
PF 19	<i>site EcoRI</i>																
	AAC	ATT	TCA	CAA	CAC	CAA	TGC	GTA	AAA	AAA	CAA	TGT	CCA	GAA	AAT		

	S	G	C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L
Bac 19	TCT	GGC	TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG
PF 19																	
	TCT	GGA	TGT	TTC	AGA	CAT	TTA	GAT	GAA	AGA	GAA	GAA	TGT	AAA	TGT	TTA	TTA

	N	Y	K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C
Bac 19	AAC	TAC	AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT
PF 19																	
	AAT	TAC	AAA	CAA	GAA	GGT	GAT	AAA	TGT	GTT	GAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	TGT

	N	E	N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D
Bac 19	AAC	GAG	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC
PF 19																	
	AAC	GAA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	GAT	GCA	GAT	GCC	AAA	TGT	ACC	GAA	GAA	GAT

	S	G	S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S
Bac 19	TCG	GGC	AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG
PF 19																	
	TCA	GGT	AGC	AAC	GGA	AAG	AAA	ATC	ACA	TGT	GAA	TGT	ACT	AAA	CCT	GAT	TCT

	Y	P	L	F	D	G	I
Bac 19	TAC	CCG	CTG	TTC	GAC	GGC	ATC
PF 19							
	TAT	CCA	CTT	TTC	GAT	GGT	ATT

va.	F	C	S	S	S	N	F	L	G	I
19	TTC	TGC	AGC	TCC	TCT	AAC	TTC	TTG	GGC	ATC
19	TTC	TGC	AGT	TCC	TCT	AAC	TTC	TTA	GGA	ATA

2	S	F	L	L	I	L	M	L	I
19	TCG	TTC	TTG	TTG	ATC	CTC	ATG	TTG	ATC
19	TCA	TTC	TTA	TTA	ATA	CTC	ATG	TTA	ATA

a	L	Y	S	F		*	*
19	TTG	TAC	AGC	TTC	ATT	TAA	TAA
19	TTA	TAC	AGT	TTC	ATT		

ATG	AAG	GCG	CTA	CTC	TTT	TTG	TTC	TCT	TTC	ATT	TTT	TTC	GTT	ACC	AAA	TGT
M	K	A	L	L	F	L	F	S	F	I	F	F	V	T	K	C
CAA	TGT	GAA	ACA	GAA	AGT	TAT	AAG	CAG	CTT	GTA	GCC	AAC	GTG	GAC	GAA	TTC
Q	C	E	T	E	S	Y	K	Q	L	V	A	N	V	D	<u>E</u>	<u>F</u>
AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC	TCT	GGC
N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N	S	G
TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG	AAC	TAC
C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L	N	Y
AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT	AAC	GAG
K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C	N	E
AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC	TCG	GGC
N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D	S	G
AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG	TAC	CCG
S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S	Y	P
CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA							
L	F	D	G	I	F	C	S	*	*							

FIGURE 1C

AGC AAC GGC AAG AAA ATC ACG TGT GAG TGT ACC AAA CCC GAC TCG TAC CCG

Fig. 2

1

R NR
PF19-A pur
G17

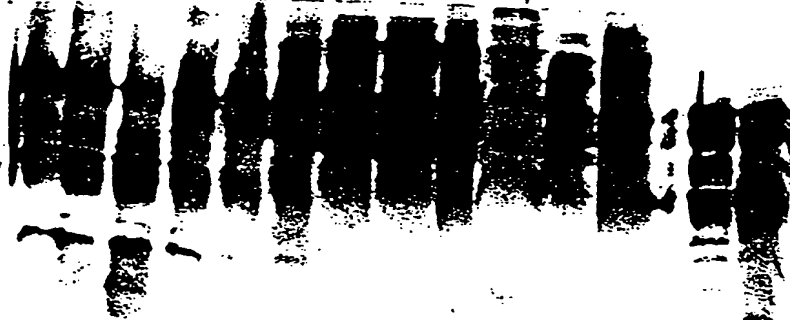
R NR
Dielmo

PF19-A pur

Fig. 3

2

5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18



ep19

NR

1 R

Synomolgi
vivax(Belem)
vivax(Sal-1)
Consensus

91 42

REGION I

OCVTTGEAES EAPEIIVPCG INEYOVVYK PLAGMYKTIK KPLENHVNAL NTNIIOMLOS ALKKANYFLO VLNSOLNPYS IPHSGEYIIK
 OCVTTGEAES EAPEILVPAG ISOYOVVYK PLAGMYKTIK KOLENHVNAL NTNIIOMLOS ALKKANYFLE VLNSOLNPFX YSPSGEYIIK
 OCVTTGEAES EAPEILVPAG ISOYOVVYK PLAGMYKTIK KOLENHVNAL NTNIIOMLOS ALKKANYFLE VLNSOLNPFX YSPSGEYIIK
 OCVTTGEAES EAPEI.VP.G I..YOVVY.K PLAGMYKTIK K.LENHVNA. NTNIIOMLOS ALKKANYFL. VLNSOLNP...SGEYIIK

Synomolgi
vivax(Belem)
vivax(Sal-1)
Consensus

181

REGION II

OPYKLLOLE. KKKLGGSYKY IGASVOMV TANDGLAYYO KMGOLYKKHU DEVACQKEV EAINIHDEE JKKKCS EASH ANDKTC LN AK
 OPYKLLOLEK KKKLGGSYKY IGASIDDLA TANDGVITYN KMGELYKTHU TAVNEEVKKV EADIKAEODK JKKKCS DSTN TTEKTC SM AK
 OPYKLLOLEK KKKLGGSYKY IGASIDDLA TANDGVITYN KMGELYKTHU TAVNEEVKKV EADIKAEODK JKKKCS DSTN TTEKTC SM AK
 OPYKLLOLE. KKKL.GSYKY IGAS.O.O.. TANDG..YY. KMG.LYK.HU..V.....K.V E..I...O...KK.G.....K...K...AK

Synomolgi
vivax(Belem)
vivax(Sal-1)
Consensus

271

REGION III

KEELOKYL PF LSSIOKEYST LVNKVHSYTO TLKKIINNCO IEKKETETIV NKLEOYSKMD EEOVYKQSK KEDOVKSSGL LEKLMNSKLI
 KAELEKYL PF LNSLOKEYES LVSKVNTYTO NLKKVINNCO LEKKEAEITV KKLOOYNKMD EKLEEYKKSE KKEVVKSSGL LEKLMNSKLI
 KAELEKYL PF LNSLOKEYES LVSKVNTYTO NLKKVINNCO LEKKEAEITV KKLOOYNKMD EKLEEYKKSE KKEVVKSSGL LEKLMNSKLI
 K.EL.KYL PF L.S.OKEY..LV.KV..YTD -LKK-INNCO -EKKE.E..V -KL.OY.KMD E..L..YK.S.K...VKSSGL LEKLM.SKLI

Synomolgi
vivax(Belem)
vivax(Sal-1)
Consensus

361

REGION IV

NQEESSKALS EL NVQOTOML NMSSEHRCID TNVPENAACY RYLDGTEWR CLLYFKEDAG KCVPA NMTC KDKNGGCAPE AECKMNDKNE
 KNESSKEILS QL NVQOTOLL TMSSEHTCID TNVPONAACY RYLDGTEWR CLLTFFKEGG KCVPAS NVTC KONNGGCAPE AECKMTDSNK
 KNESSKEILS QL NVQOTOLL TMSSEHTCID TNVPONAACY RYLDGTEWR CLLTFFKEGG KCVPAS NVTC KONNGGCAPE AECKMTDSNK
 ...ESK..LS -L NVQOTQ.L -MSSEH-CID TNVP-NAACY RYLDGTEWR CLL-FKE..G KCVPA-N-TC KD-NGGCAPE AECKMTDSNK

Synomolgi
vivax(Belem)
vivax(Sal-1)
Consensus

431

IVCKCTKEGS EPLFEGVFCS
 IVCKCTKEGS EPLFEGVFCS
 IVCKCTKEGS EPLFEGVFCS

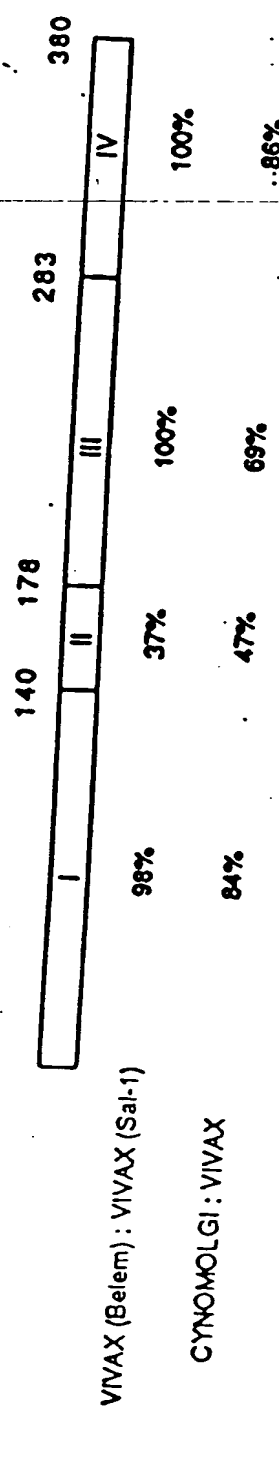
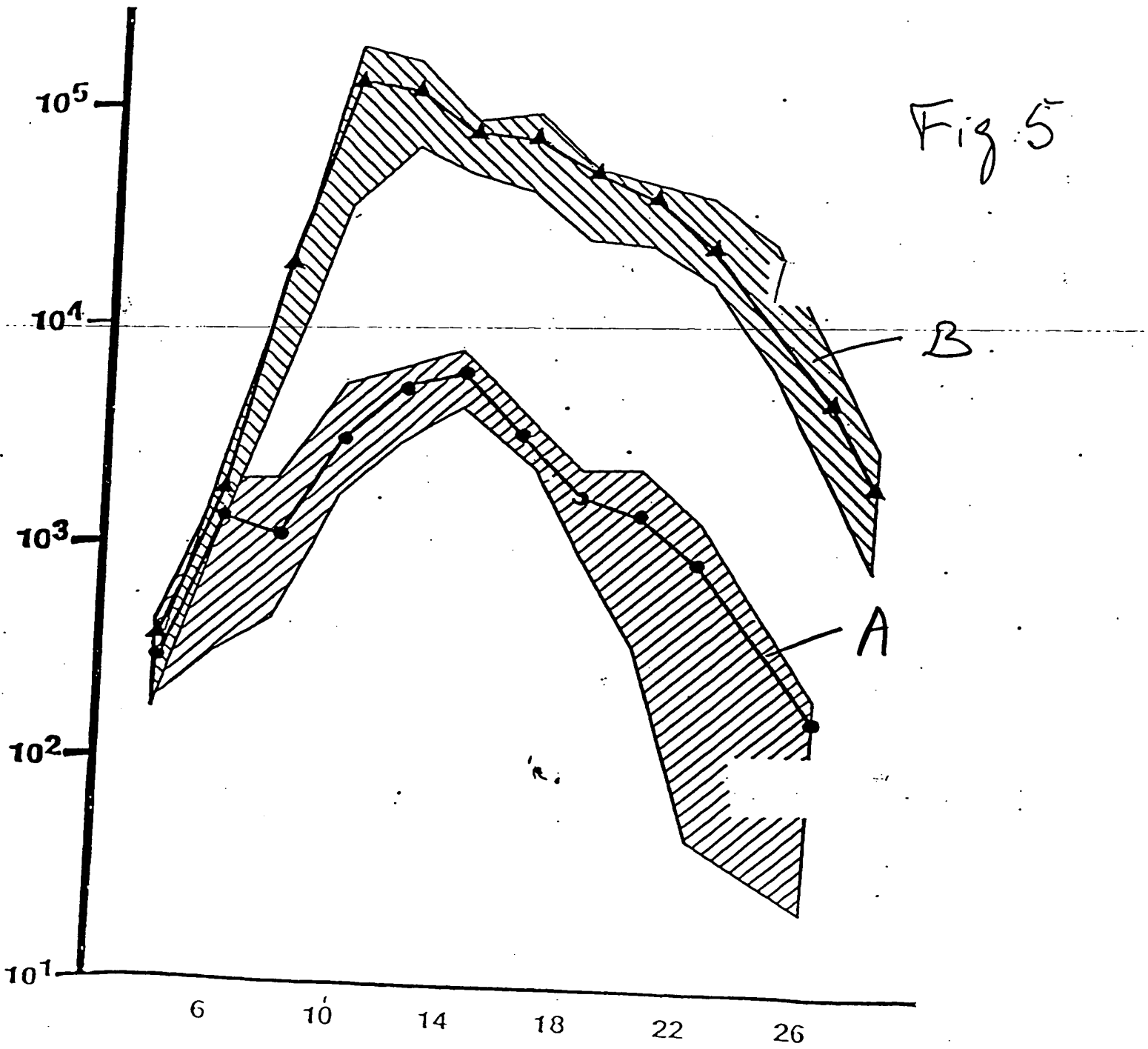
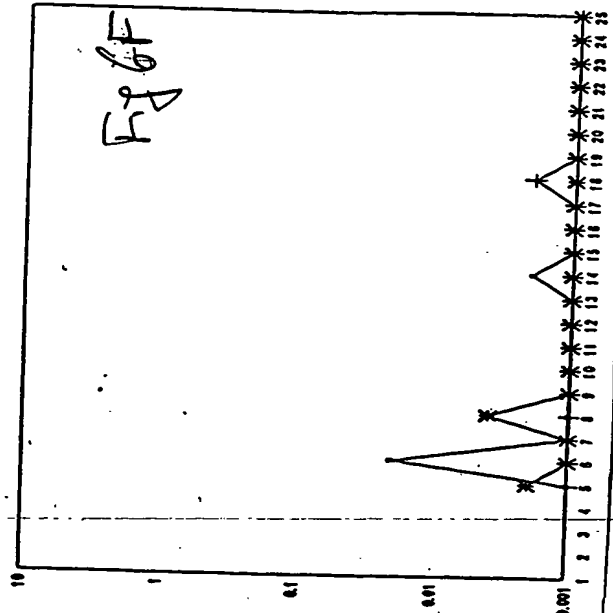
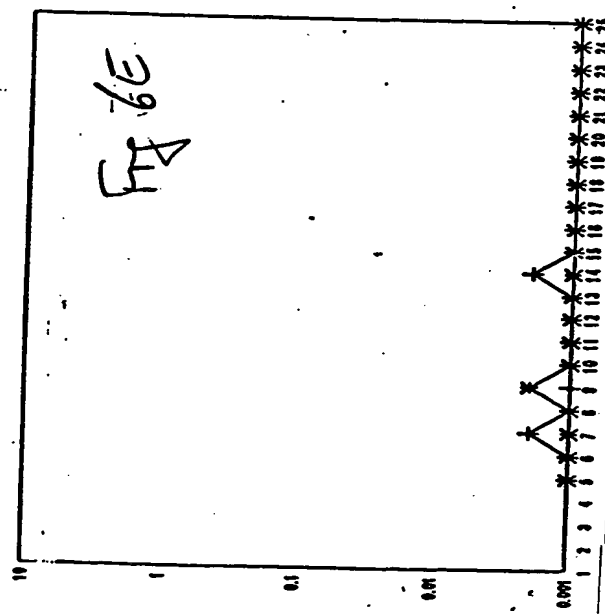
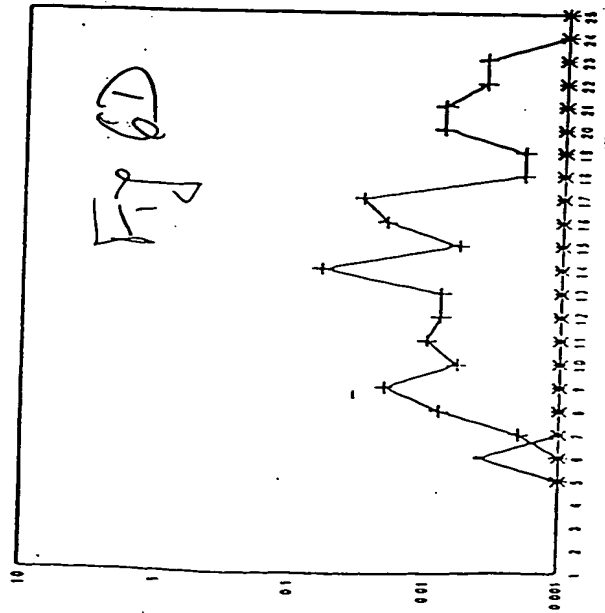
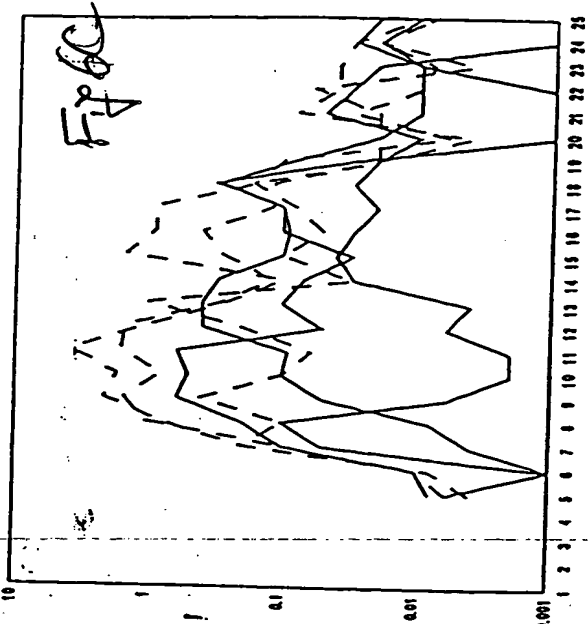
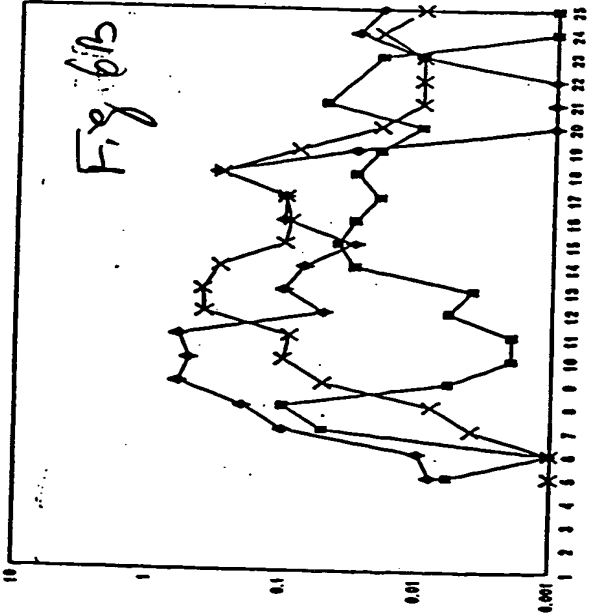
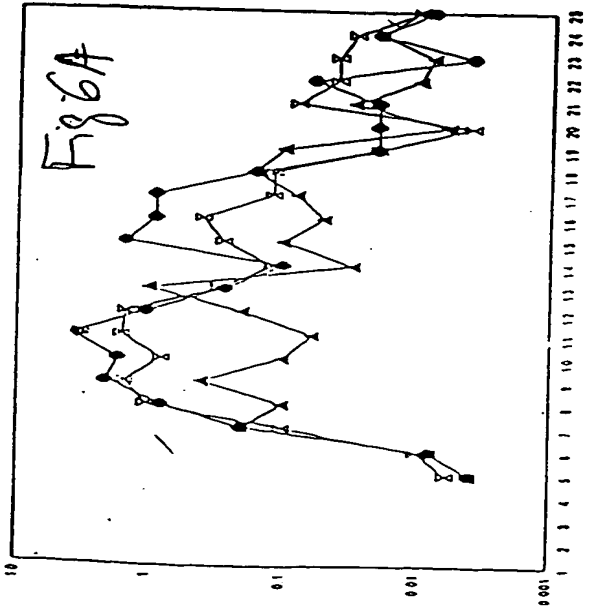


Fig. 4



Fig. 5





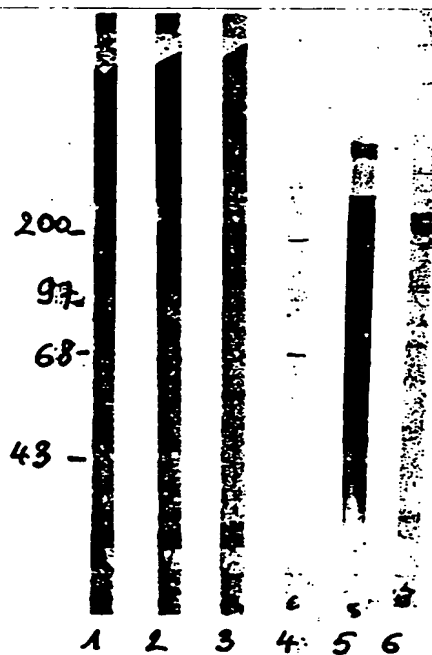


FIGURE 7

1/11

FIGURE 1A

Bac 19	E	F	N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N
	<u>GAA</u>	<u>TTC</u>	AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC
PF 19																	
			AAC	ATT	TCA	CAA	CAC	CAA	TGC	GTA	AAA	AAA	CAA	TGT	CCA	GAA	AAT
Bac 19	S	G	C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L
	TCT	GGC	TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG
PF 19																	
	TCT	GGA	TGT	TTC	AGA	CAT	TTA	GAT	GAA	AGA	GAA	GAA	TGT	AAA	TGT	TTA	TTA
Bac 19	N	Y	K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C
	AAC	TAC	AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT
PF 19																	
	AAT	TAC	AAA	CAA	GAA	GGT	GAT	AAA	TGT	GTT	GAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	TGT
Bac 19	N	E	N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D
	AAC	GAG	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC
PF 19																	
	AAC	GAA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	GAT	GCA	GAT	GCC	AAA	TGT	ACC	GAA	GAA	GAT
Bac 19	S	G	S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S
	TCG	GGC	AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG
PF 19																	
	TCA	GGT	AGC	AAC	GGA	AAG	AAA	ATC	ACA	TGT	GAA	TGT	ACT	AAA	CCT	GAT	TCT
Bac 19	Y	P	L	F	D	G	I	F	C	S	*	*					
	TAC	CCG	CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA					
PF 19																	
	TAT	CCA	CTT	TTC	GAT	GGT	ATT	TTC	TGC	AGT							

2/11

FIGURE 1B

		<i>Site Eco RI</i>																
		E	F	N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N
Bac 19		<u>GAA</u>	<u>TTC</u>	AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC
PF 19																		
				AAC	ATT	TCA	CAA	CAC	CAA	TGC	GTA	AAA	AAA	CAA	TGT	CCA	GAA	AAT
<hr/>																		
		S	G	C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L
Bac 19		TCT	GGC	TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG
PF 19																		
		TCT	GGA	TGT	TTC	AGA	CAT	TTA	GAT	GAA	AGA	GAA	GAA	TGT	AAA	TGT	TTA	TTA
<hr/>																		
		N	Y	K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C
Bac 19		AAC	TAC	AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT
PF 19																		
		AAT	TAC	AAA	CAA	GAA	GGT	GAT	AAA	TGT	GTT	GAA	AAT	CCA	AAT	CCT	ACT	TGT
<hr/>																		
		N	E	N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D
Bac 19		AAC	GAG	AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC
PF 19																		
		AAC	GAA	AAT	AAT	GGT	GGA	TGT	GAT	GCA	GAT	GCC	AAA	TGT	ACC	GAA	GAA	GAT
<hr/>																		
		S	G	S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S
Bac 19		TCG	GGC	AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG
PF 19																		
		TCA	GGT	AGC	AAC	GGA	AAG	AAA	ATC	ACA	TGT	GAA	TGT	ACT	AAA	CCT	GAT	TCT
<hr/>																		
		Y	P	L	F	D	G	I	F	C	S	S	S	N	F	L	G	I
Bac 19		TAC	CCG	CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TCC	TCT	AAC	TTC	TTG	GGC	ATC
PF 19																		
		TAT	CCA	CTT	TTC	GAT	GGT	ATT	TTC	TGC	AGT	TCC	TCT	AAC	TTC	TTA	GGA	ATA
<hr/>																		
		S	F	L	L	I	L	M	L	I	L	Y	S	F	I	*	*	
Bac 19		TCG	TTC	TTG	TTG	ATC	CTC	ATG	TTG	ATC	TTG	TAC	AGC	TTC	ATT	TAA	TAA	
PF 19																		
		TCA	TTC	TTA	TTA	ATA	CTC	ATG	TTA	ATA	TTA	TAC	AGT	TTC	ATT			

3/11

ATG	AAG	GCG	CTA	CTC	TTT	TTG	TTC	TCT	TTC	ATT	TTT	TTC	GTT	ACC	AAA	TGT
M	K	A	L	L	F	L	F	S	F	I	F	F	V	T	K	C
CAA	TGT	GAA	ACA	GAA	AGT	TAT	AAG	CAG	CTT	GTA	GCC	AAC	GTG	GAC	GAA	TTC
Q	C	E	T	E	S	Y	K	Q	L	V	A	N	V	D	<u>E</u>	<u>F</u>
AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC	TCT	GGC
N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N	S	G
TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG	AAC	TAC
C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L	N	Y
AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT	AAC	GAG
K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C	N	E
AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC	TCG	GGC
N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D	S	G
AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG	TAC	CCG
S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S	Y	P
CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA							
L	F	D	G	I	F	C	S	*	*							

FIGURE 1C

4/11

GAA	ACA	GAA	AGT	TAT	AAG	CAG	CTT	GTA	GCC	AAC	GTG	GAC	GAA	TTC		
E	T	E	S	Y	K	Q	L	V	A	N	V	D	<u>E</u>	<u>F</u>		
AAC	ATC	TCG	CAG	CAC	CAA	TGC	GTG	AAA	AAA	CAA	TGT	CCC	GAG	AAC	TCT	GGC
N	I	S	Q	H	Q	C	V	K	K	Q	C	P	E	N	S	G
TGT	TTC	AGA	CAC	TTG	GAC	GAG	AGA	GAG	GAG	TGT	AAA	TGT	CTG	CTG	AAC	TAC
C	F	R	H	L	D	E	R	E	E	C	K	C	L	L	N	Y
AAA	CAG	GAG	GGC	GAC	AAG	TGC	GTG	GAG	AAC	CCC	AAC	CCG	ACC	TGT	AAC	GAG
K	Q	E	G	D	K	C	V	E	N	P	N	P	T	C	N	E
AAC	AAC	GGC	GGC	TGT	GAC	GCA	GAC	GCC	AAA	TGC	ACC	GAG	GAG	GAC	TCG	GGC
N	N	G	G	C	D	A	D	A	K	C	T	E	E	D	S	G
AGC	AAC	GGC	AAG	AAA	ATC	ACG	TGT	GAG	TGT	ACC	AAA	CCC	GAC	TCG	TAC	CCG
S	N	G	K	K	I	T	C	E	C	T	K	P	D	S	Y	P
CTG	TTC	GAC	GGC	ATC	TTC	TGC	AGC	TAA	TAA							
L	F	D	G	I	F	C	S	*	*							

FIGURE 1D

5/11

feuille rectifiée



FIGURE 2

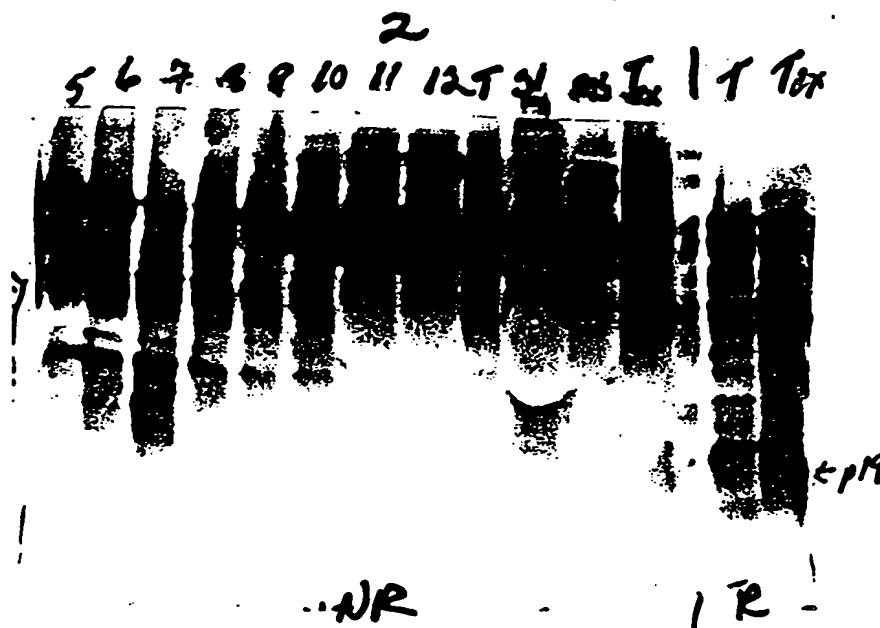


FIGURE 3

7/11

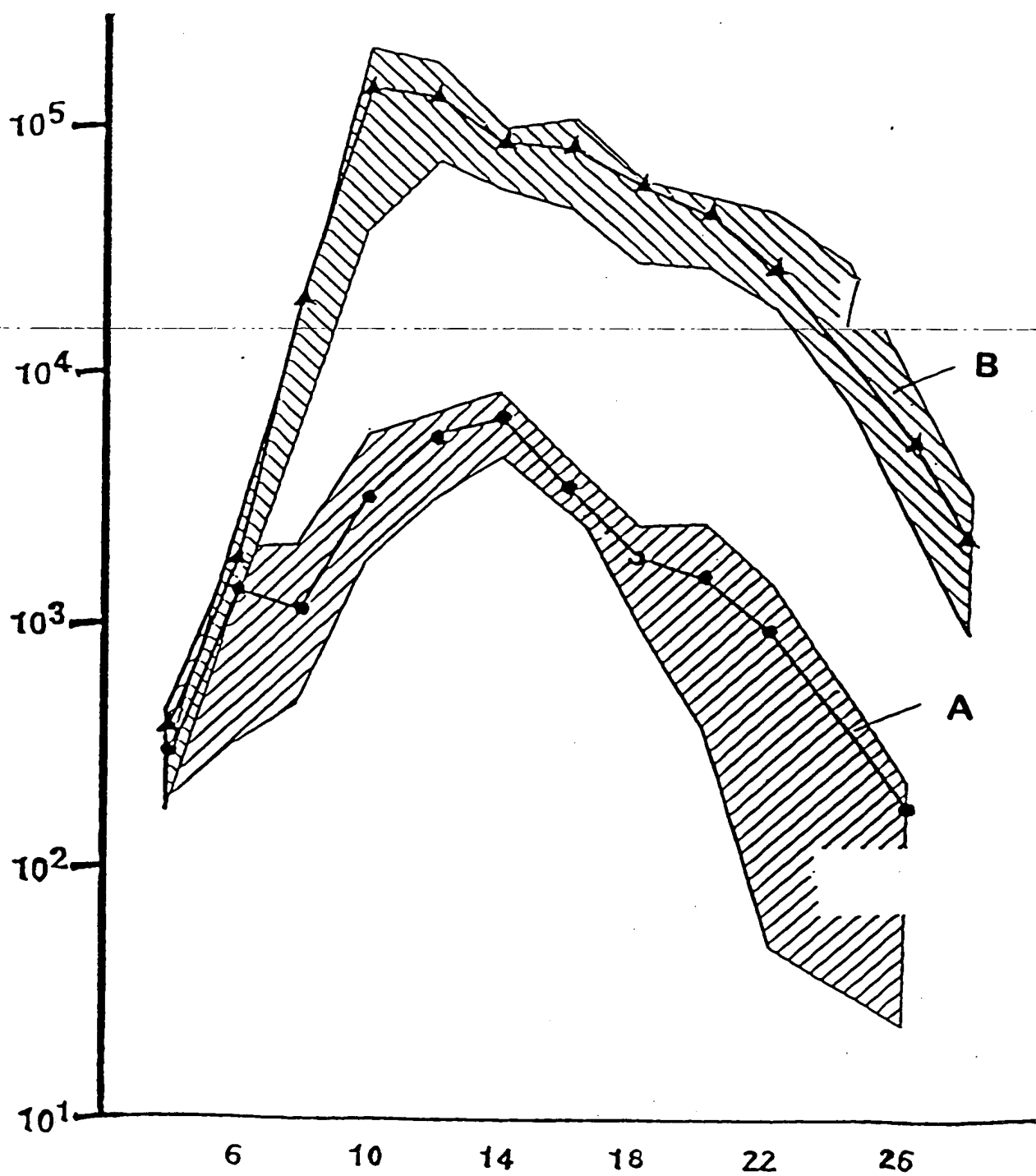


FIGURE 5

8/11

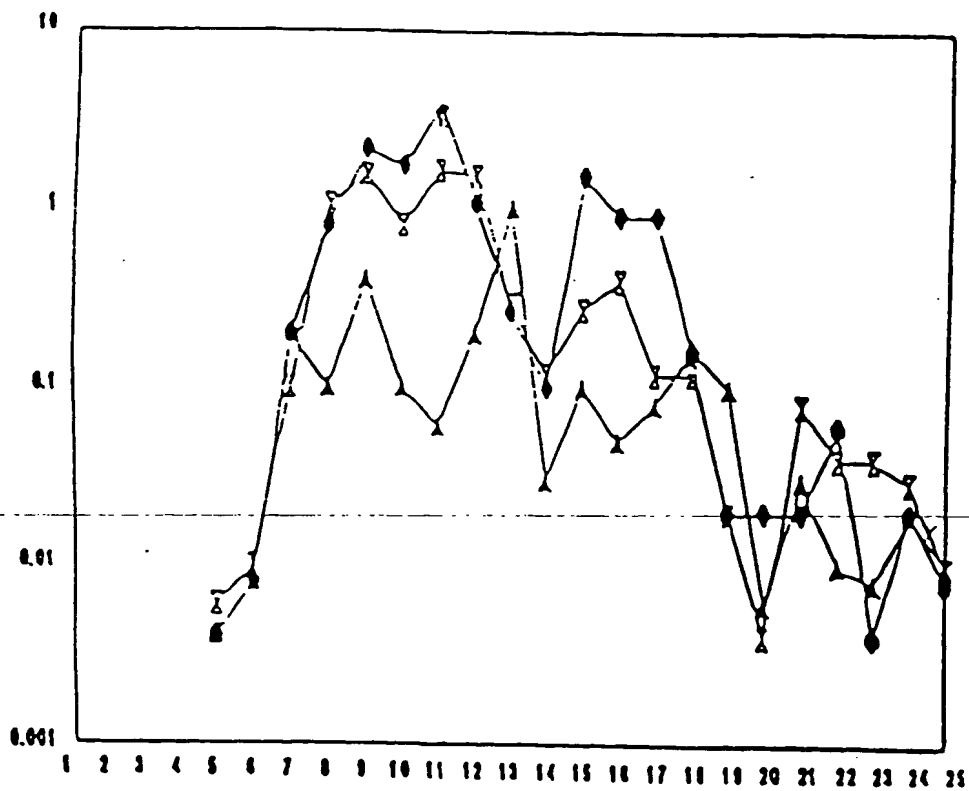


FIGURE 6A

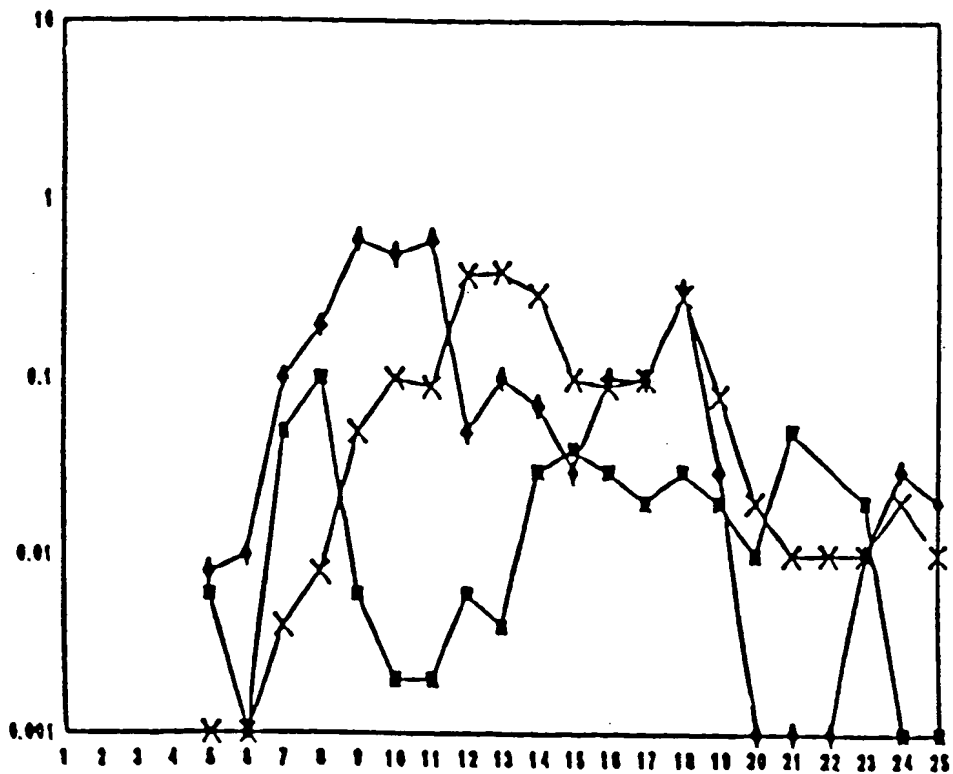


FIGURE 6B



9/11

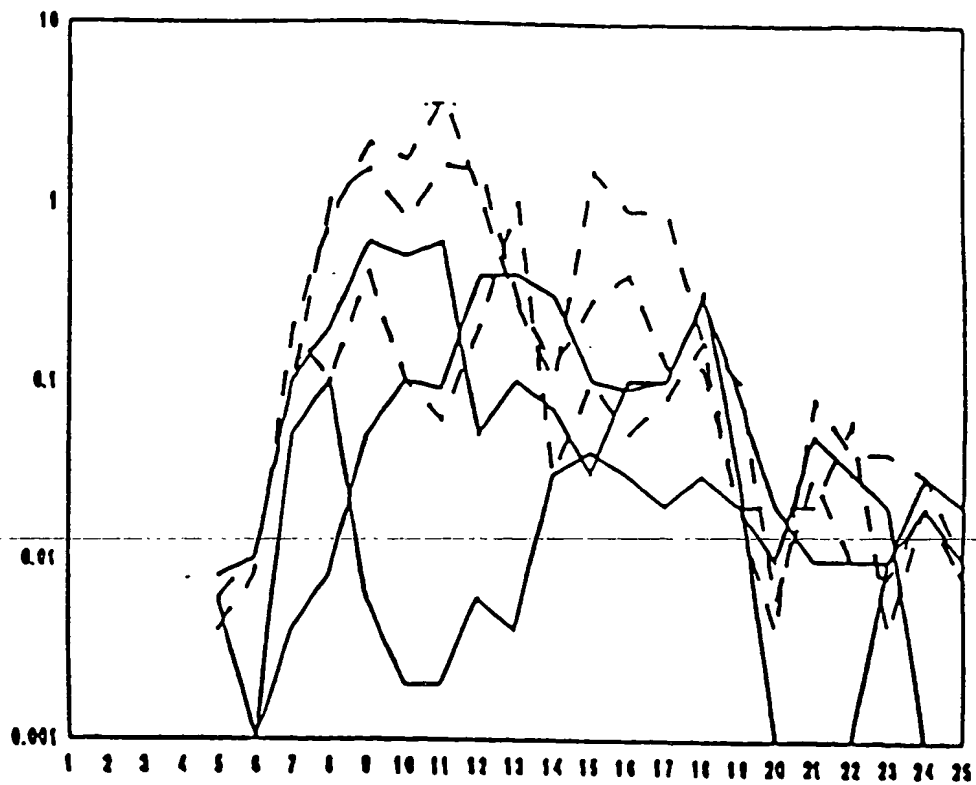


FIGURE 6C

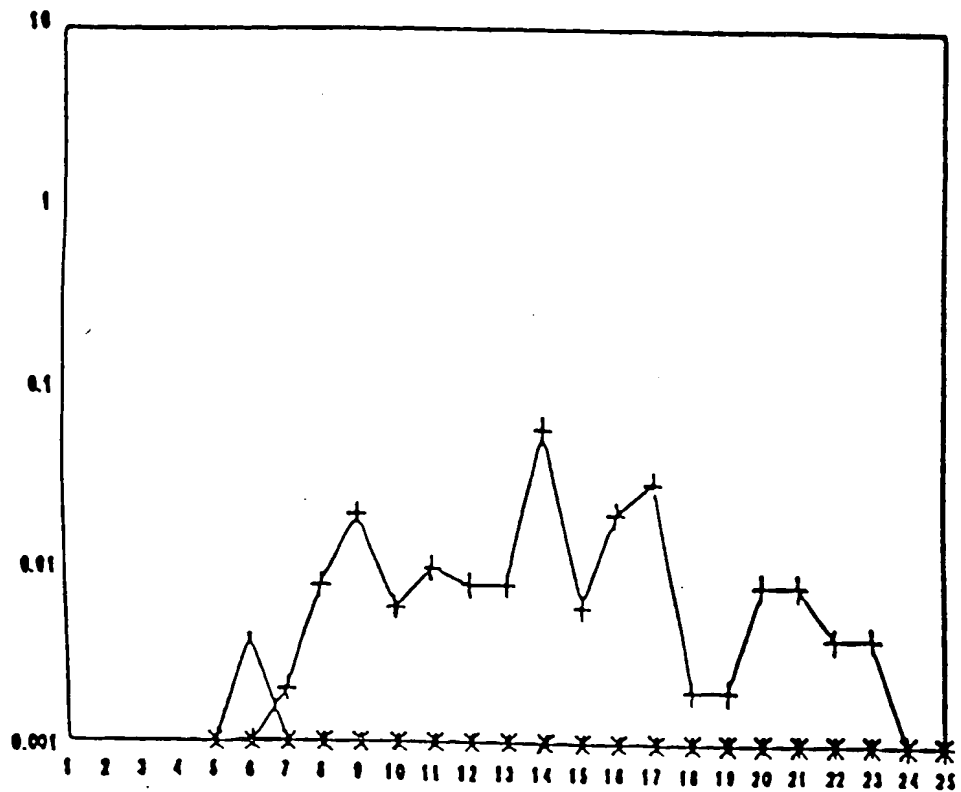


FIGURE 6D

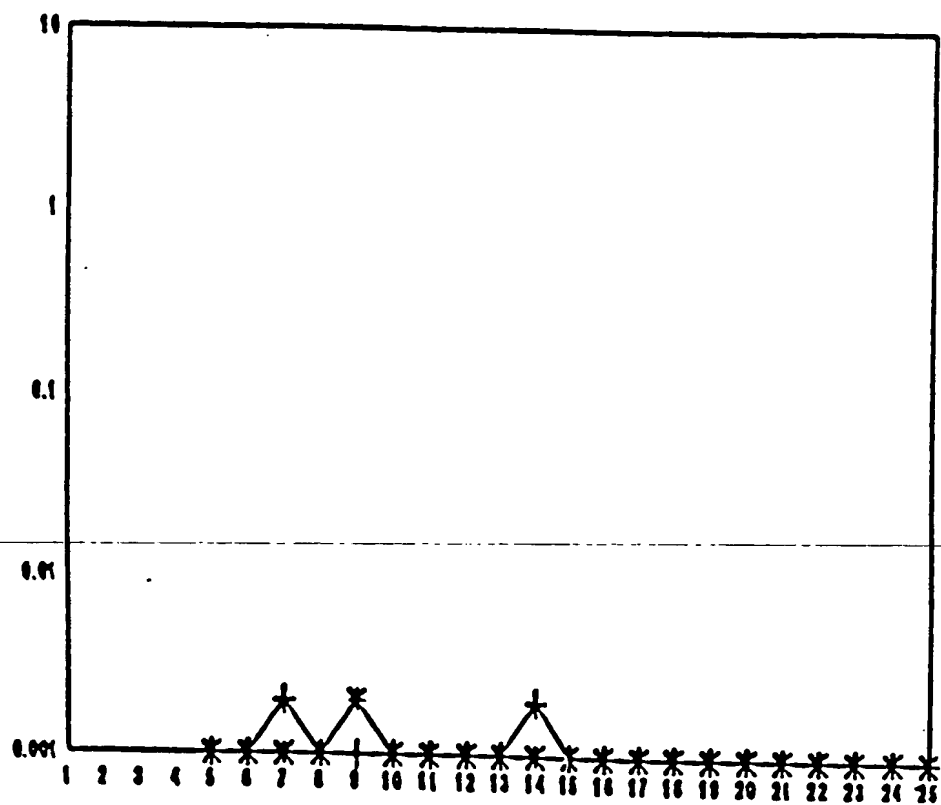


FIGURE 6E

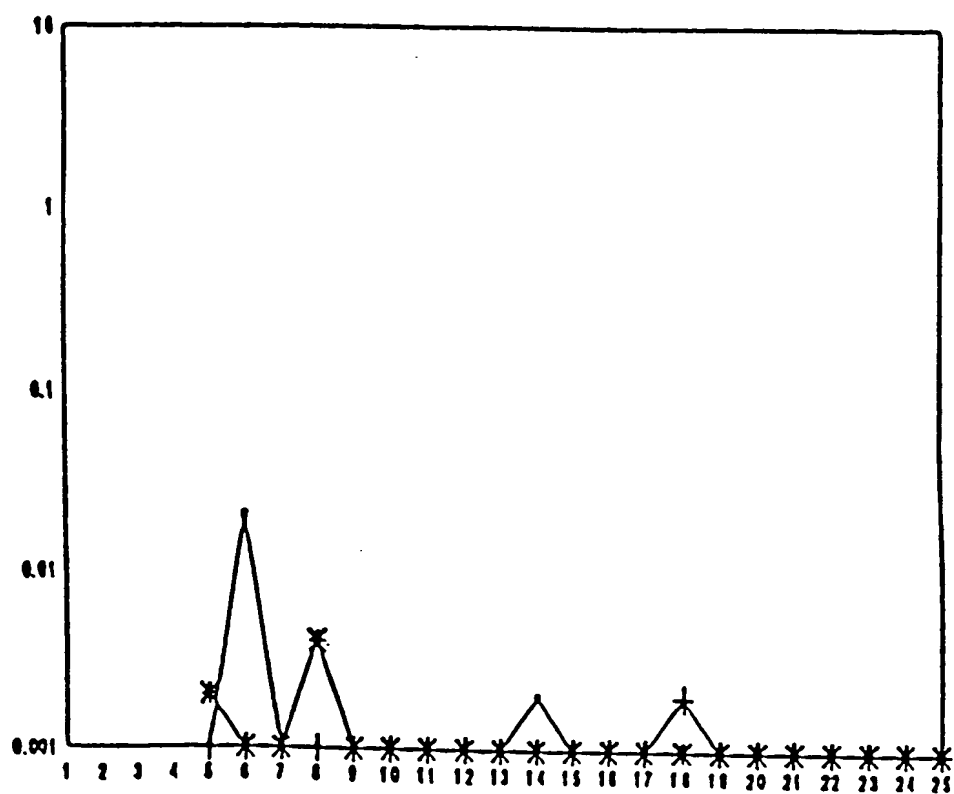


FIGURE 6F

11/11

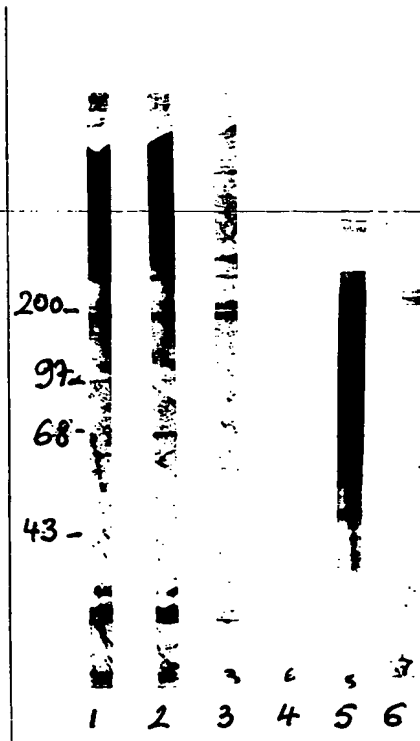


FIGURE 7

THIS PAGE BLANK (USPTO)



22850

PATENT & TRADEMARK OFFICE

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADE MARK OFFICE

VERIFICATION OF TRANSLATION

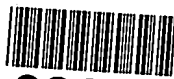
I, Dr Lesley Margaret Stone, B.Sc., Ph.D., D.M.S., of Silver Creek, Lhergy Cripperty, Union Mills, Isle of Man, IM4 4NJ, British Isles, do hereby declare that I am conversant with the English and French languages and that I am a competent translator thereof;

I verify that the attached English translation is a true and correct translation made by me of the attached document in the French language, French Patent Application Number 96 01822 filed on 14th February 1996;

I further declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that wilful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment or both under Section 1001 of Title 18 of the United States code and that such wilful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Date: 23rd June, 2000

Lesley Stone



22850

PATENT & TRADEMARK OFFICE

THIS PAGE BLANK (USPTO)

FRENCH REPUBLIC

NATIONAL INSTITUTE OF INDUSTRIAL PROPERTY

PATENT OF INVENTION

UTILITY PATENTS - PATENTS OF ADDITION

Official copy

The Director General of the National Institute of Industrial Property certifies that the appended document is the certified official copy of an application for industrial property rights registered at the Institute.

Executed in Paris on: 11 APRIL 2000

For the Director General of the
National Institute of Industrial Property
The Divisional Head

(signed)

Yves CAMPENON

INPI

NATIONAL INSTITUTE
OF INDUSTRIAL PROPERTY

26bis, rue de Saint-Pétersbourg 75800 PARIS Cédex 08
Tel: (1) 42 94 52 52 Telex: 290 368 INPI PARIS Fax: (1) 42 93 59 30
National institution founded under law No 51-444 of 19 April 1951

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<p style="text-align: center;">1</p> <p>REQUEST</p> <p>FOR GRANT OF</p> <p>AN INDUSTRIAL</p> <p>PROPERTY TITLE *</p> <table border="1" style="width: 100%; margin-top: 10px;"> <tr> <td style="width: 5%; text-align: center;">a</td> <td style="width: 5%; text-align: center;"><input checked="" type="checkbox"/></td> <td style="width: 90%;">PATENT OF INVENTION</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">b</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>UTILITY PATENT</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">c</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>DIVISIONAL APPLICATION</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">d</td> <td style="text-align: center;"><input type="checkbox"/></td> <td>CONVERSION OF A EUROPEAN PATENT APPLICATION</td> </tr> </table> <p style="font-size: small; margin-top: 5px;">For c and d: specify number, nature and date of initial application</p>		a	<input checked="" type="checkbox"/>	PATENT OF INVENTION	b	<input type="checkbox"/>	UTILITY PATENT	c	<input type="checkbox"/>	DIVISIONAL APPLICATION	d	<input type="checkbox"/>	CONVERSION OF A EUROPEAN PATENT APPLICATION	<p>2 MANDATORY OPTIONS at time of filing (except for utility patent)</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;">THE APPLICANT WISHES TO DEFER THE MAKING OUT OF THE NOVELTY SEARCH REPORT,</td> <td style="width: 10%; text-align: center;"> <input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO </td> <td style="width: 30%; font-size: small;"> IF THE OPTION CHOSEN IS NO AND IF THE APPLICANT IS A PHYSICAL PERSON, HE WISHES TO MAKE PAYMENT OF THE NOVELTY SEARCH REPORT FEE IN INSTALMENTS. </td> </tr> </table> <p style="font-size: small; margin-top: 10px;">NATURE NUMBER DATE OF INITIAL OR MAIN A</p>		THE APPLICANT WISHES TO DEFER THE MAKING OUT OF THE NOVELTY SEARCH REPORT,	<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO	IF THE OPTION CHOSEN IS NO AND IF THE APPLICANT IS A PHYSICAL PERSON, HE WISHES TO MAKE PAYMENT OF THE NOVELTY SEARCH REPORT FEE IN INSTALMENTS.
a	<input checked="" type="checkbox"/>	PATENT OF INVENTION																
b	<input type="checkbox"/>	UTILITY PATENT																
c	<input type="checkbox"/>	DIVISIONAL APPLICATION																
d	<input type="checkbox"/>	CONVERSION OF A EUROPEAN PATENT APPLICATION																
THE APPLICANT WISHES TO DEFER THE MAKING OUT OF THE NOVELTY SEARCH REPORT,	<input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO	IF THE OPTION CHOSEN IS NO AND IF THE APPLICANT IS A PHYSICAL PERSON, HE WISHES TO MAKE PAYMENT OF THE NOVELTY SEARCH REPORT FEE IN INSTALMENTS.																
<p>DATE DOCUMENTS FILED</p> <p style="text-align: center;">14-02-96</p>	<p>NATIONAL REGISTRATION N°</p> <p style="text-align: center;">96 01822</p>	<p>3 NAME AND ADDRESS OF THE CONTACT (APPLICANT OR AGENT) TO WHOM ALL C SHOULD BE ADDRESSED</p> <p>ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAU 3, rue Chauveau-Lagarde 75008 Paris (France)</p>																
<p>POSTAL CODE OF THE PLACE OF FILING</p> <p style="text-align: center;">75</p>	<p>4 DATE OF GENERAL POWER OF ATTORNEY</p> <p style="text-align: center;">12 01 1987</p>	<p>5 REFERENCE OF THE CONTACT</p> <p style="text-align: center;">B3044-EG</p>	<p>6 TELEPHONE NUMBER OF</p> <p style="text-align: center;">44-51-18-00</p>															
<p>7 TITLE OF INVENTION</p> <p style="text-align: center;">RECOMBINANT PROTEIN CONTAINING A C-TERMINAL FRAGMENT OF AN MSP-1 PROTEIN OF A PLA WHICH IS INFECTIOUS TO MAN FOR THE PRODUCTION OF ANTI-MALARIA VACCINES</p>																		
<p>8 APPLICANT: Name and forenames (underline family name) or legal name and status</p> <p style="text-align: right;">SIRENE N°, WHERE API</p> <p style="text-align: center;">INSTITUT PASTEUR Recognised private public interest foundati</p>																		
<p>9 ADDRESS IN FULL</p> <p>25-28, rue du Dr. Roux 75724 Paris CEDEX 15</p>		<p>COUNTRY</p> <p style="text-align: center;">FRANCE</p>																
<p>10 NATIONALITY(IES)</p> <p style="text-align: center;">FRENCH</p>		<p>FEE:</p> <p><input type="checkbox"/> FILING</p> <p><input type="checkbox"/> SEARCH REPORT</p> <p><input type="checkbox"/> PRIORITY CLAIM</p> <p><input type="checkbox"/> EXCESS CLAIMS (from the 11th)</p>																
<p>11 INVENTOR</p> <p>THE APPLICANT IS THE SOLE INVENTOR</p> <p style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO <small>(if the answer is no see explanatory note)</small> </p>	<p>12 IF THE APPLICANT IS A PHYSICAL PERSON NOT REQUIRED TO PAY INCOME TAX HE REQUESTS* OR HAS REQUESTED A REDUCED RATE PAYMENT*</p> <p style="text-align: center;"> <input type="checkbox"/> YES <input checked="" type="checkbox"/> NO </p>																	
<p>13 DECLARATION OF PRIORITY OR REQUEST FOR BENEFIT OF FILING DATE OF A PREVIOUS APPLICATION</p>	<p>COUNTRY OF ORIGIN</p>	<p>DATE OF FILING</p>	<p>NUMBER</p>															
<p>14</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 25%; text-align: center;"> <input type="checkbox"/> DIVISIONS </td> <td style="width: 25%; text-align: center;"> PREDATING THIS APPLICATION N° </td> <td style="width: 25%; text-align: center;"> N° </td> <td style="width: 25%; text-align: center;"> N° </td> </tr> </table>				<input type="checkbox"/> DIVISIONS	PREDATING THIS APPLICATION N°	N°	N°											
<input type="checkbox"/> DIVISIONS	PREDATING THIS APPLICATION N°	N°	N°															
<p>15 SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT NAME AND POSITION OF SIGNATORY</p> <p style="text-align: center;">ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S.A. (signed) GUTMANN ERNEST N° 92-1106</p>	<p>SIGNATURE OF THE RECEIVING OFFICER</p>	<p>SIGNATURE AFTER REGISTRATION OF THE APPLICATION AT</p> <p style="text-align: center;">(signed)</p>																

THIS PAGE BLANK (USPTO)



5 26bis, rue de Saint-Pétersbourg 75800 Paris Cédex 08 Tel: (1) 42 94 52 52 - Fax: (1) 42 93 59 30

Patents Administration Division

DESIGNATION OF THE INVENTOR

(if the applicant is not the inventor or the sole inventor)

National registration N°

96 01822

Title of invention:

**RECOMBINANT PROTEIN CONTAINING A C-TERMINAL FRAGMENT OF AN MS1
PROTEIN OF A PLASMODIUM WHICH IS INFECTIOUS TO MAN FOR THE
PRODUCTION OF ANTI-MALARIA VACCINES**

I/we the undersigned

ERNEST GUTMANN-YVES PLASSERAUD S. A.
3, rue Chauveau-Lagarde
75008 Paris (FRANCE)

designate as the inventor(s) (name, forenames, address and underline family name):

- 1) LONGACRE -ANDRE Shirley
11 rue d'Assas - 75006 Paris (France)
- 2) ROTH Charles
C/O Madame Agnès RIMOND
18 rue Geneviève Couturier - 92500 RUEIL MALMAISON (France)
- 3) NATO Faridabano
65 rue Mirabeau - 92160 ANTONY (France)
- 4) BARNWELL John W.
3 Washington Square Village - Apartment 10 D
NEW YORK N. Y. 10012 (USA)
- 5) MENDIS Kamini
P. O. Box 271, Kynsey Road
COLUMBO 8 - SRI LANKA

NOTE: Exceptionally the name of the inventor may be followed by that of his company if this is not the applicant or th

Date and signature of the applicant(s) or agent
Paris, 24th February 1997

[signed]

Ernest GUTMANN
CPI n° 92-1106

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5

10

15

20

25

30

DOCUMENT CONTAINING AMENDMENTS

PAGE(S) OF DESCRIPTION OR CLAIMS OR PAGE(S) OF DRAWINGS			A.C.*	DATE OF CORRESPONDENCE	DATE STAMP OF CORRECTOR
Amended	Deleted	Added			
1, 5, 12, 30				31/07/96	05 AUG 1996-SR
34, 35, 37, 38			X	31/07/96	05 AUG 1996-SR
Non numbered sheets (1 to 9/9)		Sheets 10 and 11/11		09/08/96	26 AUG 1996-SR
31			X	24.02.97	10 OCT 1997-SR

35

An amendment to the original claims, unless under the provisions of Article 28 of the decree of 19 September 1979, is indicated in the column "A.C." (amended claims).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[page before amendment]

**RECOMBINANT PROTEIN CONTAINING THE 91kDa C-TERMINAL
SEQUENCE OF A *PLASMODIUM* MSP-1 PROTEIN WHICH IS
INFECTIOUS TO MAN OR A FRAGMENT THEREOF FOR THE
5 PRODUCTION OF ANTI-MALARIA VACCINES**

The invention relates to novel active principles for vaccines derived from the major surface protein in merozoite forms of a *Plasmodium* which is infectious to man, more generally termed MSP-1.

10 MSP-1 has already been the subject of a number of studies. It is synthesised in the schizont stage of *Plasmodium* type parasites, in particular *Plasmodium falciparum*, and is expressed in the form of one of the major surface constituents of merozoites both in the hepatic stage and in the erythrocytic stage of malaria (1, 2, 3, 4). Because of the protein's predominant character and conservation in all known *Plasmodium* species, it has been suggested that it could be a candidate for
15 constituting anti-malarial vaccines (5, 6).

The same is true for fragments of that protein, particularly the natural cleavage products which are observed to form, for example during invasion by the parasite into erythrocytes of the infected host. Among such cleavage products are the C-terminal fragment with a molecular weight of 42 kDa (7, 8) which is itself cleaved
20 once more into an N-terminal fragment with a conventional apparent molecular weight of 33 kDa and into a C-terminal fragment with a conventional apparent molecular weight of 19 kDa (9) which remains normally fixed to the parasite membrane after the modifications carried out on it, via glycosylphosphatidylinositol (GPI) groups (10, 11).

25

[end of page before amendment]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

It is also found at the early ring stage of the intraerythrocytic development cycle (15, 16), where the observations were made that the 19 kDa fragment could play a role which is not yet known, but which is doubtless essential in re-invasive processes. This formed the basis for hypotheses formed in the past that that protein could constitute a particularly effective target for possible vaccines.

It should be understood that the references frequently made below to the p42 and p19 proteins from a certain type of *Plasmodium* are understood to refer to the corresponding C-terminal cleavage products of the MSP-1 protein of that *Plasmodium* or, by extension, to products containing substantially the same amino acid sequences, obtained by genetic recombination or by chemical synthesis using conventional techniques, for example using the "Applied System" synthesiser, or by "Merrifield" type solid phase synthesis. For convenience, references to "recombinant p42" and "recombinant p19" refer to "p42" and "p19" obtained by techniques comprising at least one genetic engineering step.

Faced with the difficulty of obtaining large quantities of parasites for *P. falciparum* and the impossibility of cultivating *P. vivax in vitro*, it has become clear that the only means of producing an anti-malaria vaccine is to resort to techniques which use recombinant proteins or peptides. However, MSP-1 is very difficult to produce whole because of its large size of about 200 kDa, a fact which has led researchers to study the C-terminal portion, the (still unknown) function of which is probably the more important.

Recombinant proteins concerning the C-terminal portion of the *P. falciparum* MSP-1 which have been produced and tested in the monkey (12) are:

- a p19 fused with a glutathione-S-transferase produced in *E. coli* (40);
- a p19 fused with a polypeptide from a tetanic anatoxin and carrying auxiliary T cell epitopes produced in *S. cerevisiae* (12).

A composition containing a p42 protein fused with a glutathione-S-transferase produced in *E. coli* combined with a Freund complete adjuvant did not exhibit a protective effect in two types of *Aotus* monkeys (*A. nancymai* and *A. vociferans*) when administered to them. The p19 protein produced in *S. cerevisiae* exhibited a protective effect in two *A. nancymai* type *Aotus* monkeys (12). In contrast, there was no protective effect in two *A. vociferans* type *Aotus* monkeys.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Some researchers (Chang et al.) have also reported immunisation tests carried out in the rabbit using a recombinant p42 protein produced in a baculovirus system and containing one amino acid sequence in common with *P. falciparum* (18). Thus these latter authors indicate that in the rabbit that recombinant p42 behaves substantially in the same way as the entire recombinant MSP-1 protein (gp195). They suggest that this p42 protein could be used in protection tests in non-human primates susceptible to infection by *P. falciparum*, in particular *Aotus* monkeys, on the basis that the p42 protein would comprise target epitopes for inhibitor antibodies formed against the purified native MSP-1 protein gp195. It is would be dangerous, even supposing that such results were to be confirmed, to conclude a protective nature in man for the antibodies thus induced to counter the parasites themselves. It should be remembered that there are currently no very satisfactory experimental models in the primate for *P. vivax* and *P. falciparum*. The *Saimiri* model, developed for *P. falciparum* and *P. vivax*, and the *Aotus* model for *P. falciparum*, are artificial systems requiring the parasite strains to be adapted and often requiring splenectomy of the animals to obtain significant parasitemia. As a result, the vaccination results from such models can only have a limited predictive value for man.

In any event, it must also be asked what the real vaccination rate would be which could possibly be obtained with such recombinant proteins, bearing in mind the discovery - reported below - of the presence in p42s from *Plasmodiums* of the same species, and more particularly in the corresponding p33s, of hypervariable regions which would in many cases render uncertain the immunoprotective efficacy of antibodies induced in individuals vaccinated with a p42 from a *Plasmodium* strain against an infection by other strains of the same species (13).

It can even be assumed that the high polymorphism of the N-terminal portion of p42 plays a significant role in immune escape, often observed for that type of parasite.

The aim of the present invention is to produce vaccinating recombinant proteins which can escape these difficulties, for which the protective effect is verifiable in genuinely significant experimental models or even directly in man.

More particularly, the invention provides vaccinating compositions against a *Plasmodium* type parasite which is infectious for man, containing as an active

THIS PAGE BLANK (USPTO)

principle a recombinant protein which may or may not be glycosylated, whose essential constituent polypeptide sequence is:

- either that of a 19 kilodalton (p19) C-terminal fragment of the surface protein 1 of the merozoite form (MSP-1 protein) of a *Plasmodium* type parasite which is infectious for man, said C-terminal fragment remaining normally anchored to the parasite surface at the end of its penetration phase into human erythrocytes in the event of an infectious cycle;

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[page before amendment]

- or that of a portion of that fragment which is also capable of inducing an immune response which can inhibit *in vivo* parasitemia due to the corresponding parasite;
- or that of an immunologically equivalent peptide of said p19 fragment or said

5 portion of that fragment; and

said recombinant possibly protein further comprising conformational epitopes which are unstable in a reducing medium and which preferably constitute the majority of the epitopes recognised by human antiserums formed against the corresponding *Plasmodium*.

10 The presence of such conformational epitopes could play an important role in the protective efficacy of the active principle of the vaccines. They are particularly found in the active principles which exhibit the other characteristics defined above, when they are produced in a baculovirus system. If needs be, it is mentioned below that the expression "baculovirus vector system" means the ensemble constituted by

15 the baculovirus type vector itself and the cell lines, in particular cells of insects transfectable by a baculovirus modified by a sequence to be transferred to these cell lines resulting in expression of that transferred sequence. Preferred examples of these two partners in the baculovirus system have been described in the article by Longacre et al. (19). The same system was used in the examples below. It goes without

20 saying, of course, that variations in the baculovirus and in the cells which can be infected by the baculovirus can be used in place of those selected.

The unstable character of these conformational epitopes in a reducing medium can be demonstrated by the test described below in the examples, in particular in the presence of β -mercaptoethanol.

25 From this viewpoint, the recombinant protein produced by Longacre et al. (14) can be used in such compositions. It should be remembered that S. Longacre et al.

[end of page before amendment]

succeeded in producing a recombinant p19 from the MSP-1 of *P. vivax* in a baculovirus vector system containing a nucleotide sequence coding for the p19 of

30 *Plasmodium vivax*, in particular by transfecting cultures of insect cells [*Spodoptera frugiperda* (Sf9) line] with baculovirus vectors containing, under the control of the polyhedrin promoter, a sequence coding for the peptide fragments defined below, with the sequences being placed in the following order in the baculovirus vector used:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- a 35 base pair 5' terminal fragment of the polyhedrin signal sequence, in which the methionine codon for initiating expression of this protein had been mutated (to ATT);
- a 5'-terminal nucleotide fragment coding for a 32 amino acid peptide
5 corresponding to the N-terminal portion of MSP-1, including the MSP-1 signal peptide;
- either a nucleotide sequence coding for p19, or a sequence coding for the p42 of the MSP-1 protein of *Plasmodium vivax*, depending on the case, these sequences also being provided with ("anchored" forms) or deprived of (soluble forms) 3' end
10 regions of these nucleotide sequences for which the end C-terminal expression products are reputed to play an essential role in anchoring the final p19 protein to the parasite membrane;
- 2 TAA stop codons.

For p42, the sequences derived from the C-terminal region of MSP-1 extend
15 as a result from amino acid Asp 1325 to amino acid Leu 1726 (anchored form) or to amino acid Ser 1705 (soluble form) and for p19, the sequences extend from amino acid Ile 1602 to amino acid Leu 1726 (anchored form) or to amino acid Ser 1705 (soluble form) it being understood that the complete amino acid sequences of p42 and p19 for which the initial and terminal amino acids have been indicated above follow
20 from the gene of the Belem isolate of *P. vivax* which has been sequenced (20).

Similar results were obtained using, in the same vector systems, nucleotide sequences coding for the p42 and p19 of *Plasmodium cynomolgi*. The interest in *P. cynomolgi* is twofold: it is a parasitic species very close to *P. vivax* which is infectious for the macaque. It can also infect man. Further, access to the natural
25 hosts of *P. cynomolgi*, rhesus monkeys and toque macaques, is also possible, to test the efficacy of the protection of MSP-1 from *P. cynomolgi* in natural systems. The rhesus monkey is considered to be one of the most representative species for immune reactions in man.

In particular, excellent results have been obtained in vaccination tests carried
30 out using the toque macaque with two recombinant polypeptides: soluble p42 and, in particular, soluble p19 derived from *P. cynomolgi*, respectively produced in a baculovirus system and purified on an affinity column with monoclonal antibodies

THIS PAGE BLANK (USPTO)

recognising the corresponding regions of the native MSP-1 protein. The following observations were made: six monkeys immunised with only p19 (three monkeys) and the p19 and p42 together (three monkeys) all exhibited practically sterile immunity after challenge infection. The results obtained in the three monkeys immunised with p42 were less significant. Two of them were as above, but since the third exhibited a lower parasitemia than the controls immunised with a PBS buffer in the presence of Freund adjuvant (3 monkeys) or not immunised (3 monkeys), it was less clear.

The particularly effective test results carried out with the macaque with recombinant polypeptides produced in a baculovirus system using a recombinant p19 from *P. cynomolgi* showed that recombinant polypeptides respectively containing recombinant p19s from other *Plasmodiums* must behave in the same manner. They are more meaningful for malaria in man than the results from tests carried out with *P. vivax* or *P. falciparum* in their "artificial hosts".

Baculovirus recombinant proteins derived from a C-terminal MSP-1 portion (p19) have a very significant antimalarial protective effect in a natural system, which constitutes the most representative model for evaluating the protective effect of MSP-1 for man.

The protective effect obtained can be further improved if the p19 form is deprived of the hypervariable region of the N-terminal portion of p42, the effect of which can be deleterious in natural situations in which the vaccinated subject is confronted by a great deal of polymorphism.

The 19 kDa C-terminal fragment, the sequence for which is present in the active principle of the vaccine, can be limited to the sequence for the p19 itself, in the absence of any polypeptide sequence normally upstream of the p19 sequence in the corresponding MSP-1 protein. Clearly, though, the essential constituent polypeptide sequence of the active principle can also comprise a polypeptide sequence for the C-terminal side belonging to the 33 kDa (p33) N-terminal fragment still associated with the p19 in the corresponding p42, before natural cleavage of the latter, if the presence of this fragment does not modify the immunological properties of the active principle of the vaccine. As will be seen below, in particular in the description of the examples, the C-terminal sequences of the p33 in various varieties of *Plasmodium* (see the C-terminal portion of the peptide sequences of "region III" in Figure 4) also have a degree of homology or substantial conservation of the sequence, for example of

THIS PAGE BLANK (USPTO)

the order of at least 80%, in different varieties of *Plasmodiums* which are infectious for man, such that they do not fundamentally modify the vaccinating properties of the active principle (the sequence corresponding to region IV in Figure 4), in particular using the hypothesis which follows from this figure; the presumed cleavage site between the p19 and region III of the p33 is located between the leucine and asparagine residues in a particularly well conserved region (LNVQTQ).

Normally the C-terminal polypeptide sequence of the p33, when it is present, comprises less than 50 amino acid residues, or even less than 35, preferably less than 10 amino acid residues.

In contrast, the essential constituent polypeptide sequence of the active principle of the vaccine need not comprise all of the sequence coding for p19, naturally providing that the latter retains the ability to induce antibodies which protect against the parasite. In particular, the molecular weight of the "fragment portion" is 10 to 25 kDa, in particular 10 to 15 kDa. Preferably, this polypeptide fragment portion contains at least one of the two EGF (Epidermal Growth Factor) regions.

Clearly, the skilled person could distinguish between active fragments and those which ceased to be so, in particular experimentally by producing modified vectors containing inserts originating from the p19 with different lengths, respectively isolated from the fragments obtained from the sequence coding for p19, by reaction with appropriate restriction enzymes, or by exonucleolytic enzymes which would be kept in contact with the fragment coding for p19 for differing periods; the capacity of the expression products from these inserts in the corresponding eukaryotic cells, in particular in insect cells, transformed by the corresponding modified vectors, to exert a protective effect can then be tested, in particular under the experimental conditions which are described below in the examples. In particular, the expression products of these inserts must be able to inhibit a parasitemia induced *in vivo* by the corresponding whole parasite.

Thus, the invention includes all vaccinating compositions in which the essential constituent polypeptide sequence of the active principle is constituted by a peptide which can induce a cellular and/or humoral type immunological response equivalent to that produced by p19 or a fragment as defined above, provided that the addition, deletion or substitution in the sequence of certain amino acids by others would not cause

THIS PAGE BLANK (USPTO)

a large modification of the capacity of the modified peptide - hereinafter termed the "immunologically equivalent peptide" - to inhibit said parasitemia.

The p19 fragment can naturally also be associated at the N-terminal side or the C-terminal side or via a peptide bond to a further plasmoidal protein fragment having a
5 vaccinating potential (such as Duffy binding protein from *P. vivax* (29) or EBA-175 from *P. falciparum* (30) and (31), one region of which is specifically rich in cysteine), provided that its capacity to inhibit parasitemia normally introduced *in vivo* by the corresponding parasite is not altered but is amplified.

Upstream of the N-terminal end of p19, the fragment coding for p19 or a portion
10 thereof can also contain a peptide sequence which is different again, for example a C-terminal fragment of the signal peptide used, such as that for the MSP-1 protein. This sequence preferably comprises less than 50 amino acids, for example 10 to 40 amino acids.

These observations pertain in similar fashion to the p19s from other
15 *Plasmodium*, in particular *P. falciparum*, the dominant species of the parasites, responsible for one of the most serious forms of malaria.

However, the techniques summarised above for producing a recombinant p19 from *P. vivax* or *P. cynomolgi* in a baculovirus system are difficult to transpose unchanged to producing a recombinant p19 of *P. falciparum* in a satisfactory yield, if
20 only to obtain appreciable quantities which will allow immunoprotective tests to be carried out.

The invention also provides a process which overcomes this problem to a large extent. It also becomes possible to obtain much higher yields of *P. falciparum* p19 - and other *Plasmodiums* where similar difficulties are encountered - using a synthetic
25 nucleotide sequence substituting the natural nucleotide sequence coding for the p19 of *Plasmodium falciparum* in an expression vector of a baculovirus system, this synthetic nucleotide sequence coding for the same p19, but being characterized by a higher proportion of G and C nucleotides than in the natural nucleotide sequence.

In other words, the invention follows from the discovery that expression of a
30 nucleotide sequence coding for a p19 in a baculovirus system is apparently linked to an improved compatibility of successive codons in the nucleotide sequence to express with the "cellular machinery" of the host cells transformable by the baculovirus, in the manner of that observed for the natural nucleotide sequences normally contained

THIS PAGE BLANK (USPTO)

in these baculovirus and expressed in the infected host cells; hence the poor expression, or even total absence of expression of a native *P. falciparum* nucleotide sequence; hence also a possible explanation of the more effective expression observed by Longacre et al. (14) for the p19 of *P. vivax* in a baculovirus system and, 5 as the inventors have also shown, of the *P. cynomolgi* sequence from corresponding native p19 nucleotide sequences, because of their relatively much higher amounts of G and C nucleotides than those of the native nucleotide sequences coding for the p19 of *P. falciparum*.

The invention thus more generally provides a recombinant baculovirus type 10 modified vector containing, under the control of a promoter contained in said vector and able to be recognised by cells transfectable by said vector, a first nucleotide sequence coding for a signal peptide exploitable by a baculovirus system,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[page before amendment]

characterized by a second nucleotide sequence downstream of the first, also under the control of the promoter and coding for the peptide sequence:

- either of a 19 kilodalton (p19) C-terminal fragment of the surface protein 1 of the merozoite form (MSP-1 protein) of a *Plasmodium* type parasite other than *Plasmodium vivax* which is infectious for man, said C-terminal fragment remaining normally anchored to the parasite surface at the end of its penetration phase into human erythrocytes in the event of an infectious cycle;
- or of a portion of that peptide fragment provided that the expression product from the second sequence in a baculovirus system is also capable of inducing an immune response which can inhibit *in vivo* parasitemia due to the corresponding parasite;
- or of an immunologically equivalent peptide of said C-terminal peptide fragment (p19) or said peptide fragment portion by addition, deletion or substitution of amino acids not resulting in a large modification of the capacity of said immunologically equivalent peptide to induce a cellular and/or humoral type immunological response similar to that produced by said p19 peptide fragment or said portion of said fragment; and

said nucleotide sequence having, if necessary, a G and C nucleotide content in the range 40% to 60%, preferably at least 50%, of the totality of the nucleotides from which it is constituted. This sequence can be obtained by constructing a synthetic gene in which the natural codons have been changed for codons which are rich in G/C without modifying their translation (maintaining the peptide sequence).

The nucleotide sequence, provided by a synthetic DNA, may have at least 10% of modified codons with respect to the natural gene sequence or cDNA and retains the characteristics of the natural translated sequence, i.e., maintains the amino acid sequence.

[end of page before amendment]

It is not excluded that this G and C nucleotide content could be further increased provided that the modifications resulting therefrom as to the amino acid sequence of the recombinant peptide - or immunologically equivalent peptide - produced did not result in a loss of immunological properties, or protective

THIS PAGE BLANK (USPTO)

properties, of the recombinant proteins formed, in particular in the tests which will be described below.

These observations naturally apply to other *Plasmodium* which are infectious for man, in particular those where the native nucleotide sequences coding for
5 corresponding p19s would have T and A nucleotide contents which were poorly compatible with effective expression in a baculovirus system.

The sequence coding for the signal used can be that normally associated with the native sequence of the *Plasmodium* concerned. But it can also originate from another *Plasmodium*, for example *P. vivax* or *P. cynomolgi* or another organism if it
10 can be recognised as a signal in a baculovirus system.

The sequence coding for p19 or a fragment thereof in the vector under consideration is, in one case, deprived of the anchoring sequence of the native protein to the parasite from which it originates, in which case the expressed protein is generally excreted into the culture medium (soluble form). It is also remarkable in
15 this respect that under the conditions of the invention, the soluble and anchored forms of the recombinant proteins produced, in particular when they are from *P. falciparum* or *P. cynomolgi* or *P. vivax*, tend to form oligomers, this property possibly being at the origin of the increased immunogenicity of the recombinant proteins formed.

The invention also concerns vectors in which the coding sequence contains
20 the terminal 3' end sequence coding for the hydrophobic C'-terminal end sequence of the p19 which is normally implicated in the induction of anchoring the native protein to the cell membrane of the host in which it is expressed. This 3'-terminal end region can also be heterologous as regards the sequence coding for the soluble p19 portion, for example corresponding to the 3'-terminal sequence from *P. vivax* or from another
25 organism when it codes for a sequence which anchors the whole of the recombinant protein produced to the cell membrane of the host of the baculovirus system used. An example of such anchoring sequences is the GPI of the CD59 antigen which can be expressed in the cells of *Spodoptera frugiperda* (32) type insects or the GPI of a CD14 human protein (33).

30 The invention also, naturally, concerns recombinant proteins, these proteins comprising conformational epitopes recognised by human serums formed against the corresponding *Plasmodium*.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In general, the invention also concerns any recombinant protein of the type indicated above, provided that it comprises conformational epitopes such as those produced in the baculovirus system, in particular those which are unstable in a reducing medium.

5 The invention also, naturally, concerns said recombinant proteins, whether they are in their soluble form or in the form provided with an anchoring region, in particular to cellular hosts used in the baculovirus system.

 The invention also encompasses oligomers spontaneously produced in the baculovirus systems used or produced *a posteriori*, using conventional protein
10 oligomerisation techniques. The most commonly used technique involves glutaraldehyde. However, any conventional system for bridging between the respective amine and carboxyl functions in proteins can be used. As an example, any of the techniques described in European patent application EP-A-0 602 079 can be used.

15 The term "oligomer" means a molecule containing 2 to 50 monomer units, each of the monomer units containing p19 or a fragment thereof, as defined above, capable of forming an aggregate. The invention also encompasses any conjugation product between a p19 or a p19 fragment as defined above, and a carrier molecule - for example a polylysine-alanine - for use in producing vaccines, via bonds which are
20 covalent or otherwise. The vaccinating compositions using them also form part of the invention.

 The invention still further concerns vaccine compositions using these oligomeric or conjugated recombinant proteins, including proteins from *Plasmodium vivax*, these observations also extending to oligomers of these recombinant proteins.

25 The invention also encompasses compositions in which the recombinant proteins defined above are associated with an adjuvant, for example an alum. Recombinant proteins containing the C-terminal end region allowing them to anchor to the membrane of the cells in which they are produced are advantageously used in combination with lipids which can form liposomes appropriate to the production of
30 vaccines. Without being limiting, lipids described, for example, in the publication entitled "Les liposomes aspects technologique, biologique et pharmacologique" [Liposomes: technological, biological and pharmacological aspects] by J. Delattre et al., INSERM, 1993, can be used.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The presence of the anchoring region in the recombinant protein, whether it is a homologous or heterologous anchoring region as regards the vaccinating portion proper, encourages the production of cytophilic antibodies, in particular IgG_{2a} and IgG_{2b} type in the mouse which could have a particularly high protective activity, so that associating the active principles of the vaccines so constituted with adjuvants other than the lipids used to constitute the liposome forms could be dispensed with. This amounts to a major advantage, since liposomes can be lyophilised under conditions which enable them to be stored and transported, without the need for chains of cold storage means.

Other characteristics of the invention will become clear from the following description of examples of recombinant proteins of the invention and the conditions under which they can be produced. These examples are not intended to limit the scope of the invention.

Description of the PfMSP1_{p19}S (soluble) construction (soluble p19 from *P. falciparum*)

The recombinant construction PfMSP1_{p19}S contains the DNA corresponding to 8 base pairs of the leader sequence and the first 32 amino acids of the MSP-1 of *Plasmodium vivax* from Met₁ to Asp₃₂ (Belem isolate; Del Portillo et al., 1991, P. N. A. S., 88, 4030) followed by GluPhe due to the EcoR1 site connecting the two fragments. This is followed by the synthetic gene described in Figure 1, coding the *Plasmodium falciparum* MSP1_{p19} from Asn₁₆₁₃ to Ser₁₇₀₅ (Uganda-Palo Alto isolate; Chang et al., 1988, Exp. Parasitol., 67, 1). The construction is terminated by two TAA stop codons. This construction gave rise to a recombinant protein which was secreted in the culture supernatant from infected cells.

In the same manner and for comparison, a recombinant construction was produced under conditions which were similar to those used to produce the p19 above, but working with a coding sequence consisting of a direct copy of the corresponding DNA of the *P. falciparum* strain (FUP) described by Chang et al., Exp. Parasit. 67,1; 1989. The natural gene copy (from asparagine 1613 to serine 1705) was formed from the native gene by PCR.

Figure 1A shows the sequences of both the synthetic gene (Bac19) and the "native gene" (PF19).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

It can be seen that 57 codons of the 93 codons of the native sequence coding for the p19 from *P. falciparum* were modified (the third nucleotide in 55 of them and the first and third nucleotides in the other 2 codons). New codons were added to the 5' end to introduce the peptide signal under the conditions indicated above and to introduce an EcoRI site for cloning, and similarly two stop codons were added which were not present in the *P. falciparum* p19 to obtain expression termination signals. The individual letters placed above successive codons correspond to the respective successive amino acids. Asterisks (*) show the stop codons. Vertical lines indicate the nucleotides which are the same in the two sequences

10 **Description of the PfMSP1_{p19}A construction (anchored GPI) (anchored p19 of *P. falciparum*)**

The PfMSP1_{p19}A construction had the characteristics of that above except that the synthetic sequence (**Figure 1B**) codes for the MSP1_{p19} of *Plasmodium falciparum* (Uganda-Palo Alto isolate) from Asn₁₆₁₃ to Ile₁₇₂₆ followed by two TAA stop codons. This construction gave rise to a recombinant protein which was anchored in the plasma membrane of infected cells by a glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) type structure.

Figure 1C represents the PfMSP1_{p19}S recombinant protein sequence before cutting out the signal sequence.

Figure 1D represents the PfMSP1_{p19}S recombinant protein sequence after cutting out the signal sequence.

The amino acids underlined in Figures 1C and 1D originate from the EcoRI site used to join the nucleotide sequences derived from the N-terminal portion of the MSP-1 of *P. vivax* (with signal sequence) and the MSP-1_{p19} of *P. falciparum*.

Figure 2 - The soluble recombinant PfMSP1_{p19} antigen purified by immunoaffinity was analysed by immunoblot using SDS-PAGE in the presence (reduced) or absence (non reduced) of B-mercaptoethanol. Samples were charged onto gel after heating to 95°C in the presence of 2% SDS. Under these conditions only covalent type bonds (disulphide bridges) can resist disaggregation. The left hand blot was revealed with a monoclonal antibody which reacted with a linear epitope of natural p19. The right hand blot was revealed with a mixture of 13 human antisera originating from subjects with acquired immunity to malaria due to *Plasmodium falciparum*. These results show that the recombinant baculovirus

THIS PAGE BLANK (USPTO)

molecule can reproduce conformational epitopes in the form of a polymer the majority of which are recognised by human antiserum.

Figure 3 - The soluble PvMSP1_{p42} recombinant antigen (Longacre et al., 1994, op. Cit.) was incubated for 5 hours at 37°C in the presence of protein fractions
 5 derived from merozoites of *P. falciparum* and separated by isoelectrofocussing. The samples were then analysed by immunoblot in the presence (reduced) or absence (non reduced) of B-mercaptoethanol. Isoelectrofocussing fractions 5 to 12, and two total merozoite extracts made in the presence (Tex) or absence (T) of detergent, were analysed. The immunoblot was revealed with monoclonal antibodies specific for
 10 MSP1_{p42} and p₁₉ of *P. vivax*. The results suggest that there is a proteolytic activity in the *P. falciparum* merozoites which can be extracted with detergent. Digestion of p42 in certain fractions appears to cause polymerisation of the digestion products (p19); this polymerisation is probably linked to the formation of disulphide bridges since in the presence of B-mercaptoethanol, the high molecular weight forms disappear in
 15 favour of a molecule of about 19 kDa (Tex-R). The p19 polymerisation observed in these experiments could thus be an intrinsic property of this molecule *in vivo*.

Description of the PcMSP1_{p19}S (soluble) construction (soluble p19 of *P. cynomolgi*)

The DNA used for the above construction was obtained from a clone of the
 20 *Plasmodium cynomolgi ceylonesis* strain (22-23). This strain had been maintained by successive passages through its natural host (*Macaca sinica*) and cyclic transmissions via mosquitoes (27).

Blood parasites in the mature schizont stage were obtained from infected monkeys when the parasitemia had attained a level of 5%. They were then purified
 25 using the methods described in (25). The DNA was then extracted as described in (26).

A 1200 base pair fragment was produced using a PCR reaction using the oligonucleotides underlined in **Figure 4** originating from *P. vivax*. The 5' oligonucleotide comprised an EcoRI restriction site and the 3' oligonucleotide comprised two synthetic TAA stop codons followed by a BgIII restriction site. This
 30 fragment was introduced by ligation and via these EcoRI and BgIII sites into the pVLSV₂₀₀ plasmid already containing the signal sequence for the MSP-1 protein of *P. vivax* (19). The new plasmid (pVLSV₂₀₀C₄₂) was used to analyse the DNA sequences.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The *P. cynomolgi* sequences and the corresponding *P. vivax* sequences were aligned. The black arrows designate the presumed primary and secondary cleavage sites. They were determined by analogy with known sites in *P. falciparum* (27, 28). The vertical lines and horizontal arrows localise the limits of the four regions which were studied. Region 4 corresponded to the sequence coding for the *P. cynomolgi* p19. Glycosylation sites are boxed and the conserved cysteines are underlined. The lower portion of **Figure 4** shows the percentage identity between the two isolates of *P. vivax* and *P. cynomolgi*.

The recombinant construction PcMSP1_{p19}S contains the DNA corresponding to 8 base pairs of the leader sequence and the first 32 amino acids of the MSP-1 of *Plasmodium vivax* from Met₁ to Asp₃₂ (Belem isolate; Del Portillo et al., 1991, P. N. A. S., 88, 4030) followed by GluPhe, due to the EcoR1 site, connecting the two fragments. This is followed by the sequence coding for the *Plasmodium cynomolgi* MSP1_{p19} from Lys₂₇₆ to Ser₃₈₀ (Ceylon strain). The construction was terminated by two TAA stop codons. This construction gave rise to a recombinant protein which was secreted in the culture supernatant of infected cells.

Purification of recombinant PfMSP1p19 protein by immunoaffinity chromatography with a monoclonal antibody specifically recognising the p19 of *Plasmodium falciparum*

The chromatographic resin was prepared by binding 70 mg of a monoclonal antibody to 3 g of activated CNBr-Sepharose 4B (Pharmacia) using standard methods detailed in the procedure employed by Pharmacia. The culture supernatants containing the soluble PfMSP1p19 were batch incubated with the chromatographic resin for 16 hours at 4°C. The column was washed once with 20 volumes of 0.05% NP40, 0.5 M of NaCl, PBS; once with 5 volumes of PBS and once with 2 volumes of 10 mM sodium phosphate, pH 6.8. Elution was carried out with 30 ml of 0.2 M glycine, pH 2.2. The eluate was neutralised with 1 M sodium phosphate, pH 7.7 then concentrated by ultrafiltration and dialysed against PBS. To purify the anchored PfMSP1p19, all of the washing and elution solutions contained a supplement of 0.1% of 3-(dimethyl-dodecylammonio)-propane sulphonate (Fluka).

Recombinant *Plasmodium vivax* (p42 and p19) MSP1 vaccination test in the squirrel monkey *Saimiri sciureus*

THIS PAGE BLANK (USPTO)

This vaccination test was carried out on male non splenectomised 2 to 3 year old *Saimiri sciureus boliviensis* monkeys. Three monkeys were injected 3 times intramuscularly at 3 week intervals with a mixture of about 50 to 100 µg each of recombinant soluble PvMSP1_{p42} and p19 (19), purified by immunoaffinity. Complete and incomplete Freund adjuvant was used as follows: 1st injection: 1:1 FCA/FIA; 2nd injection: 1:4 FCA/FIA; 3rd injection: FIA. These adjuvant compositions were then mixed 1:1 with the antigen in PBS. Five control monkeys received the glutathione-S-transferase (GST) antigen produced in *E. coli* using the same protocol. The challenge infection was carried out by injecting 2 x 10⁶ red blood cells infected with an adapted *Plasmodium vivax* strain (Belem) 2.5 weeks after the final injection. The protection was evaluated by determining parasitemia daily in all animals by examining smears stained with Giemsa.

The curves in **Figure 5** show the variation in the measured parasitemia as the number of parasited red blood cells per microlitre of blood (up the ordinate, logarithmic scale) as a function of the time passed after infection (in days). Curve A corresponds to the average values observed in the three vaccinated monkeys; curve B corresponds to the average values in the five control monkeys.

An examination of the Figure shows that the effect of the vaccination was to greatly reduce the parasitemia.

20 **Recombinant *Plasmodium cynomolgi* (p42 and p19) MSP1 vaccination test in the toque macaque *Macaca sinica***

Fifteen captured monkeys were used as follows: (1) 3 animals injected with 100 µg of soluble PcMSP1_{p42}; 3 animals injected with 35 µg (1st injection) or 50 µg (2nd and 3rd injections) of soluble PcMSP1_{p42}; (3) 3 animals injected with a mixture of PcMSP1_{p42} and p19; (4) 3 animals injected with adjuvant plus PBS; (5) 3 animals not injected. Complete and incomplete Freund adjuvant was used in the protocol described above. Injections were intramuscular at 4 week intervals. The challenge infection was made by injecting 2 x 10⁵ red blood cells infected with *Plasmodium cynomolgi* 4 weeks after the last injection. Protection was evaluated by determining parasitemia daily in all animals by examining the parasitemia with Giemsa. Parasitemia were classified as negative only after counting 400 smear fields. The parasitemia were expressed as a percentage of parasitised red blood cells.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figures 6A – 6F show the results obtained. Each of them shows parasitemia (expressed as the percentage of parasitised red blood cells up the ordinate on a logarithmic scale) observed in the challenge animals as a function of the time after infection (in days along the abscissa).

5 The results relate to:

- in **Figure 6A**; non vaccinated control animals;
- **Figure 6B** relates to animals which received a saline solution also containing Freund adjuvant;
- **Figure 6C** is a superposition of figures 6A and 6B, with the aim of highlighting
10 the relative results resulting from administration of Freund adjuvant to the animals (the variations are clearly not significant);
- **Figure 6D** provides the results obtained at the end of vaccination with p42;
- **Figure 6E** concerns animals vaccinated with p19 alone;
- finally, **Figure 6F** concerns animals vaccinated with a mixture of p19 and p42.

15 The p42 certainly induced a certain level of protection. However, as shown in Figures 6E and 6F, the protection conferred by the recombinant p19 of the invention was considerably better.

The hypothesis can be formulated that the improved protection results from secondary cleavage of p42 which is accompanied by revealing free cysteine which, as
20 a result, forms intermolecular bridges giving rise to p19 multimers which are highly characteristic of this form in recombinant proteins of the three species tested.

Vaccination test with a recombinant *Plasmodium falciparum* p19 in the squirrel monkey

25 Monkeys bred in captivity were injected intramuscularly with 1 ml of inoculum twice at 4 week intervals as follows: (1) 4 animals injected with 50 µg of soluble PfMSP1p19 in the presence of Freund adjuvant as follows: 1st injection: 1:1 FCA/FIA; 2nd injection: 1:4 FCA/FIA; and mixed then 1:1 with the antigen in PBS; (2) 4 animals injected with 50 µg of soluble PfMSPp19 in the presence of 10 mg of alum; (3) 4 animals injected with about 50 µg of GPI anchored PfMSP1p19
30 reconstituted into liposomes composed of 1:1 molar cholesterol and phosphatidyl choline. The animals were bled 17 days after the second injection.

THIS PAGE BLANK (UPTO)

Red cells from a squirrel monkey with 30% parasitemia due to *P. falciparum* (with the mature forms in the majority) were washed with PBS and the residue was diluted 8 times in the presence of 2% SDS and 2% dithiothreitol and heated to 95° before being charged onto a polyacrylamide gel of 7.5% (separation gel) and 4% (stacking gel). After transfer to nitrocellulose, immunoblot analysis was carried out with antisera as follows: (1) pool of antisera of 4 monkeys vaccinated with soluble PfMSP1p19 in Freund adjuvant, twentieth dilution; (2) pool of antisera of 4 monkeys vaccinated with soluble PfMSP1p19 in alum adjuvant, twentieth dilution; (3) pool of antisera of 4 monkeys vaccinated with anchored PfMSP1p19 in liposomes, twentieth dilution; (4) monoclonal antibody, which reacts with a linear epitope of PfMSP1p19, 50 mg/ml; (5) SHI90 antisera pool originating from about twenty monkeys repeatedly infected with *P. falciparum* and which had become unaffected by any subsequent infection with *P. falciparum*, five hundredth dilution; (6) antiserum pool of unaffected monkeys (never exposed to *P. falciparum*), twentieth dilution.

The results show that the 3 antiserum pools of monkeys vaccinated with PfMSP1p19 reacted strongly and specifically with very high molecular weight complexes (diffuse in the stacking gel) and present in parasite extracts containing more mature forms. These results support the hypothesis that a specific aggregate of PfMSP1p19 is present *in vivo* comprising epitopes which are reproduced in recombinant PfMSP1p19 molecules synthesised in the baculovirus system, in particular oligomeric forms thereof.

Figure 7 also illustrated these results. It shows immunoblots produced on gel. The first three gel tracks illustrate the *in vivo* response of monkeys to injections of p19 [(1) with Freund adjuvant, (2) with alum, (3) in the form of a liposome] and in particular the existence of high molecular weight complexes supporting the hypothesis of *in vivo* aggregation of p19 in the form of an oligomer, specific to the maturation stage (when p42 is cut into p19 and p33).

This vaccination test also comprises a third injection identical to the previous injections. The injection with Freund adjuvant contained only FIA.

There were two animal controls for each group, namely: 2 control animals injected with PBS and Freund adjuvant; 2 control animals injected with PBS and alum; 2 control animals injected with liposomes without protein; and two control

THIS PAGE BLANK (USPTO)

animals injected with PBS without adjuvant. Protection was evaluated as described above.

The invention also, of course, concerns other applications, for example those described below with respect to certain of the examples, although these are not
5 limiting in character.

Therapy

The recombinant molecule PfMSP1p19 can be used to produce specific antibodies which can possibly be used by passive transfer for a therapy for severe malaria due to *P. falciparum* when there is a risk of death.

10 Diagnostics

The recombinant molecule PfMSPp19, derived from baculovirus, can and have been used to produce specific murine monoclonal antibodies. These antibodies, in combination with polyclonal anti-MSP1p19 antisera originating from another species such as the rabbit or goat can form the basis of a semi-quantitative diagnostic
15 test for malaria which can distinguish between malaria due to *P. falciparum*, which can be fatal, and malaria due to *P. vivax*, which is generally not fatal. The principle of this test is to trap and quantify any MSP-1 molecule containing the p19 portion in the blood.

In this context, the advantages of the MSP1p19 molecule are as follows:

- 20 (i) it is both extremely well conserved in the same species and sufficiently divergent between different species to enable specific species reactants to be produced. No cross reaction has been observed between antibodies derived from PfMSP1p19 and PvMSP1p19;
- (ii) the function of MSP1p19, while not known with precision, seems to be
25 sufficiently important that this molecule does not vary significantly or is deleted without lethal effect for the parasite;
- (iii) it is a major antigen found in all merozoites and thus it must in principle be detectable even at low parasitemia and proportionally to the parasitemia;
- (iv) since the recombinant MSP1p19 molecules derived from baculovirus appear to
30 reproduce more of the native structure of MSP1p19, the antibodies produced against these proteins will be well adapted to diagnostic use.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

The microorganisms identified below have been deposited under Rule 6.1 of the Treaty of Budapest of 1st February 1996, under the following registration numbers:

<u>Identification reference</u>	<u>Registration numbers</u>
PvMSP1p19A	I-1659
PvMSP1p19S	I-1660
PfMSP1p19A	I-1661
PfMSP1p19S	I-1662
PcMSP1p19S	I-1663

5 The invention also concerns the use of these antibodies, preferably fixed to a solid support (for example for affinity chromatography) for the purification of type p19 peptides initially contained in a mixture.

 Purification means bringing this mixture into contact with an antibody, dissociating the antigen-antibody complex and recovering the purified p19 type
10 peptide.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REFERENCES

- (1) Holder, J.A. et al. (1982) Biosynthesis and processing of a *Plasmodium falciparum* schizont antigen recognised by immune serum and a monoclonal antibody". J. Exp. Med. 156 :1528-1538.
- 5 (2) Howard, R. et al. (1984) "Localisation of the major *Plasmodium falciparum* glycoprotein on the surface of mature intracellular trophozoites and schizonts". Mol. Biochem. Parasitol. 11: 349-362.
- (3) Pirson, P. et al. (1985) "Characterization with monoclonal antibodies of a surface antigen of *Plasmodium falciparum* merozoites ". J. Immunol. 134 1946-1951 .
- 10 (4) Aley, S.B. et al. (1987) "*Plasmodium vivax*: Exoerythrocytic schizonts recognized by monoclonal antibodies against blood-stage schizonts ". Exp. Parasitol. 64 :188-194.
- (5) Holder, A.A. (1988) "The precursor to major merozoite surface antigen: structure and role in immunity". Prog. Allergy 41: 72-97.
- 15 (6) Cooper, J.A. (1993) "Merozoite surface antigen-1 of *Plasmodium*". Parasitol. Today 9 : 50-54.
- (7) Holder, A.A., et al. (1987) "Processing of the precursor to the major merozoite antigens of *Plasmodium falciparum*" Parasitology 94:199-208.
- (8) Lyon, J.A. et al. (1986) "Epitope map and processing scheme for the 195 000-
20 dalton surface glycoprotein of *Plasmodium falciparum* merozoites deduced from cloned overlapping segments of the gene". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 2989-2993.
- (9) Blackman, M.J. et al. (1992) "Secondary processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 (MSP1) by calcium-dependent
25 membrane-bound serine protease: shedding of MSP1₃₃ as a noncovalently associated complex with other fragments of the MSOP1 ". Mol, Biochem. Parasitol. 50 : 307-316.
- (10) Haldar, K., et al. (1985) "Acylation of a *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen via sn-1,2-diacyl glycerol". J. Biol. Chem. 260: 4969-4974.
- 30 (11) Braun Breton, C. et al. (1990) "Glycolipid anchorage of *Plasmodium falciparum* surface antigens". Res. Immunol. 141 : 743-755.
- (12) Kumar, S. et al. (1995) " Immunogenicity and *in vivo* Efficacy of Recombinant *Plasmodium falciparum* Merozoite surface protein-1 in Aotus Monkeys ".

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Molecular Medicine, Vol.1, 3: 325-332.

- (14) Longacre, S. et al. (1994) "*Plasmodium vivax* merozoite surface protein 1 C-terminal recombinant proteins in baculovirus ". Mol. Biochem. Parasitol. 64:191-205.
- 5 (15) McBride, J.S. et al. (1987) "Fragments of the polymorphic Mr 185 000 glycoprotein from the surface of isolated *Plasmodium falciparum* merozoites form an antigenic complex". Mol. Biochem. Parasitol. 23 : 71-84.
- (16) Blackman, M.J. et al. (1990) "A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of
10 invasion-inhibiting antibodies ". J. Exp. Med. 172 : 379-382.
- (17) Kaslow, D.C. et al. (1994) " Expression and antigenicity of *Plasmodium falciparum* major merozoite surface protein (MSP1₁₉) variants secreted from *Saccharomyces cerevisiae*". Mol. biochem. Parasitol. 63 ; 283-289.
- 15 (18) Chang, S.P., et al. (1992) "A carboxyl-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* gp195 expressed by a recombinant baculovirus induces antibodies that completely inhibit parasite growth ". J. Immunol. 149 : 548-555
- (19) Longacre, S. (1995) "The *Plasmodium cynomolgi* merozoite surface protein 1 C-terminal sequence and its homologies with other *Plasmodium* species ". Mol.
20 Biochem. Parasitol. 74:105-111.
- (20) Del Portillo, H.A., et al. (1990) " Primary structure of the merozoite surface antigen 1 of *Plasmodium vivax* reveals sequences conserved between different *Plasmodium* species". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 4030-4034.
- (21) Gibson, H.L., et al. (1992) "Structure and expression of the gene for Pv200, a
25 major blood-stage surface antigen of *Plasmodium vivax*". Mol. biochem. Parasitol. 50 : 325-334.
- (22) Dissanaik, A.S., et al. (1965) "Two new malaria parasites, *Plasmodium cynomolgi ceylonensis* sub sp. nov. and *Plasmodium fragile* sp. nov. from monkeys in Ceylon". Ceylon Journal of Medical Science 14:1-9.
- 30 (23) Cochrane, A.H., et al. (1986) " Further studies on the antigenic diversity of the circumsporozoite proteins of the *Plasmodium cynomolgi* complex". Am. J. Trop. Med. Hyg. 35 : 479-487.
- (24) Naotunne, T. de S., et al. (1990) "*Plasmodium cynomolgi*: serum-mediated

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- (25) Ihalamulla, R.L. et al. (1987) "*Plasmodium vivax*: isolation of mature asexual stages and gametocytes from infected human blood by colloidal silica (Percoll) gradient centrifugation ". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81: 25-28.
- (26) Kimura, E., et al. (1990) "Genetic diversity in the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum*: high prevalence of a third polymorphic form detected in strains derived in strains derived from malaria patients". Gene 91: 57-62.
- (27) Heidrich, H.-G., et al. (1989) "The N-terminal amino acid sequences of the *Plasmodium falciparum* (FCBI) merozoite surface antigen of 42 and 36 kilodalton, both derived from the 185-195 kilodalton precursor". Mol. Biochem. Parasitol. 34 :147-154.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[page before amendment]

- (28) Blackman, M.J., et al. (1991) " Proteolytic processing of the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 produces a membrane-bound fragment containing two epidermal growth factor-like domains". Mol. Biochem. Parasitol. 49 : 29-34.
- (29) Adams, J.M. et al. (1992) "A family of erythrocyte binding proteins of malaria parasites". Proc. Natl. Acad. Sci, 89:7085-7089.
- (30) Sim B. K.L. (1995) " EBA-175: An erythrocyte-binding ligand of *Plasmodium falciparum*". Parasitology Today, vol.II, no 6:213-217.
- 10 (31) Sim B.K.L. (1994) " Receptor and ligand domains for invasion of erythrocytes by *Plasmodium falciparum*". Science, 264:1941-1944,
- (32) Davies, A. et al. (1993), Biochem J. 295 (Pt3) : 889-896. " Expression of the glycosylphosphatidylinositol-linked complement-inhibiting protein CD59 antigen in insect cells using a baculovirus vector".
- 15 (33) Haziot A. et al. (1994) J. Immunol. 152: 5868. "Recombinant soluble CD14 Inhibits LPS-Induced Tumor Necrosis Factor & Production by Cells in Whole Blood ".

[end of page before amendment]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[page before amendment]

CLAIMS

1. A recombinant protein in which the essential constituent polypeptide sequence is:
- 5 • either that of a 19 kilodalton (p19) C-terminal fragment of the surface protein 1 of the merozoite form (MSP-1 protein) of a *Plasmodium* type parasite other than *Plasmodium vivax* which is infectious to man, the C-terminal fragment remaining normally anchored to the parasite surface at the end of its penetration phase into human erythrocytes in the event of an
- 10 infectious cycle;
- or that of a portion of that fragment which is also capable of inducing an immune response which can inhibit *in vivo* parasitemia due to the corresponding parasite;
- or that of a peptide which is capable of inducing a cellular and/or humoral
- 15 immunological response equivalent to that produced by said p19 fragment or said portion of that fragment; and
- said recombinant protein possibly comprising conformational epitopes which are unstable in a reducing medium and which constitute the majority of the epitopes recognised by human antiserums formed against the corresponding
- 20 *Plasmodium*.
2. A recombinant protein according to claim 1, characterized in that it is essentially deprived of any polypeptide sequence normally upstream of the C-terminal polypeptide sequence of the p33 (33 kDa N-terminal fragment) normally on the side associated with the p19 in the corresponding p42, before
- 25 natural cleavage of the latter, said last C-terminal polypeptide sequence of the p33 containing less than 50 amino acid residues when it is present.

[end of page before amendment]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[amended page]

CLAIMS

1. A recombinant protein in which the essential constituent polypeptide sequence is:
- 5 • either a 19 kilodalton (p19) C-terminal fragment of the surface protein 1 of the merozoite form (MSP-1 protein) of a *Plasmodium* type parasite other than *Plasmodium vivax* which is infectious to man, the C-terminal fragment remaining normally anchored to the parasite surface at the end of its penetration phase into human erythrocytes in the event of an infectious
- 10 cycle;
- or a portion of that fragment which is also capable of inducing an immune response which can inhibit *in vivo* parasitemia due to the corresponding parasite;
- or a peptide which is capable of inducing a cellular and/or humoral
- 15 immunological response equivalent to that produced by said p19 fragment or said portion of that fragment; and
- said recombinant protein comprising conformational epitopes which are unstable in a reducing medium and which preferably constitute the majority of the epitopes recognised by human antiserums formed against the
- 20 corresponding *Plasmodium*.
2. A recombinant protein according to claim 1, characterized in that it is essentially deprived of any polypeptide sequence normally upstream of the C-terminal polypeptide sequence of the p33 (33 kDa N-terminal fragment) normally on the side associated with the p19 in the corresponding p42, before
- 25 natural cleavage of the latter, said last C-terminal polypeptide sequence of the p33 containing less than 50 amino acid residues when it is present.

[end of amended page]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3. A recombinant protein according to claim 1, characterized in that it is essentially deprived of any polypeptide sequence normally upstream of the C-terminal polypeptide sequence of the p33 (33 kDa N-terminal fragment)
5 normally associated with the p19 in the corresponding p42 before natural cleavage of the latter, said last C-terminal polypeptide sequence of the p33 containing less than 10 amino acid residues when it is present.
4. A recombinant protein according to claim 1, characterized in that it is essentially deprived of any polypeptide sequence normally upstream of the C-terminal polypeptide sequence of the p33 (33 kDa N-terminal fragment)
10 normally associated with the p19 in the corresponding p42 before natural cleavage of the latter, said last C-terminal polypeptide sequence of the p33 being limited, when it is present, to that which retains a substantial degree of conservation in *Plasmodium* which are infectious for man, such as *P. falciparum* or *P. vivax*.
15
5. A recombinant protein according to any one of claims 1 to 4, characterized in that the portion of p19 fragment contains at least one of the two EGF regions normally contained in this p19.
6. A recombinant protein according to any one of claims 1 to 5, characterized in
20 that the molecular weight of said p19 fragment or of said portion of p19 fragment is in the range 10 to 25 kDa, in particular in the range 10 to 15 kDa.
7. A recombinant protein according to any one of claims 1 to 6, characterized in that it also comprises a glycosylphosphatidylinositol (GPI) group of the type enabling the p19 fragment to anchor to the host cell, in particular a eukaryote
25 cell, preferably a cell of an insect infectable by a baculovirus, in which said recombinant protein is expressed.
8. A recombinant protein according to any one of claims 1 to 6, characterized in that it is deprived of the extremely hydrophobic C-terminal portion which intervenes in induction of anchoring of said recombinant protein to the cell
30 membrane of the host in which it is expressed, in particular in a eukaryote cell, preferably a cell of an insect infectable by a baculovirus.
9. A recombinant protein according to claim 8, characterized in that it is hydrosoluble.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- 100

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[page before amendment]

- 5 • either that of a 19 kilodalton (p19) C-terminal fragment of the surface protein 1 of the merozoite form (MSP-1 protein) of a *Plasmodium* type parasite which is infectious for man, said C-terminal fragment remaining normally anchored to the parasite surface at the end of its penetration phase into human erythrocytes in the event of an infectious cycle;
 - or that of a portion of that fragment which is also capable of inducing an immune response which can inhibit *in vivo* parasitemia due to the corresponding parasite;
 - 10 • or that of a peptide which is capable of inducing a cellular and/or humoral immunological response equivalent to that produced by said p19 fragment or said portion of that fragment; and
- said recombinant protein possibly comprising conformational epitopes which are unstable in a reducing medium and which constitute the majority of the
- 15 epitopes recognised by human antisera formed against the corresponding *Plasmodium*.
16. A vaccinating composition according to claim 15, characterized in that its active principle consists of a recombinant protein according to any one of claims 2 to 11 or 14, or an oligomer according to claim 12 or claim 13.
- 20 17. A vaccinating composition against a *Plasmodium* type parasite which is infectious for man, containing as an active principle an oligomer of a recombinant protein according to claim 15 or claim 16.
18. An antibody specifically recognising the p19 of a MSP-1 protein of the merozoite form of a *Plasmodium* type parasite which is infectious for man
- 25 other than *Plasmodium vivax* and which does not recognise *Plasmodium vivax*.
19. An antibody according to claim 18, characterized in that it does not recognise *Plasmodium vivax*.

[end of page before amendment]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[amended page]

20. An antibody according to claim 18, characterized in that it is monoclonal and in that it specifically recognises the p19 of *P. falciparum*.
21. A monoclonal antibody according to claim 18, characterized in that it specifically recognises the p19 of *P. vivax*.
22. A differential diagnostic process to distinguish between a parasitic infection due to *P. vivax* and a parasitic infection due to another *Plasmodium*, characterized by bringing a biological sample infected with a *Plasmodium* into contact with an antibody according to claim 21 and with an antibody according to claim 19 or claim 20, and detecting the production or no production of an immunological reaction depending on the case.
23. A recombinant baculovirus type modified vector containing, under the control of a promoter contained in the vector and able to be recognised by cells transfectable by said vector, a first nucleotide sequence coding for a signal peptide which is compatible with expression in a baculovirus system, characterized by a second sequence downstream of the first, also under the control of said promoter and coding for the peptide sequence:
- either that of a 19 kilodalton (p19) C-terminal fragment of the surface protein 1 of the merozoite form (MSP-1 protein) of a *Plasmodium* type parasite which is infectious for man, the C-terminal fragment remaining normally anchored to the parasite surface at the end of its penetration phase into human erythrocytes in the event of an infectious cycle;
 - or that of a portion of that peptide fragment provided that the expression product from the second sequence in a baculovirus system is also capable of inducing an immune response which can inhibit *in vivo* parasitemia due to the corresponding parasite;

[end of amended page]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- or that of a peptide which is capable of inducing a cellular and/or humoral immunological response equivalent to that produced by said peptide fragment p19 or said peptide fragment portion; and
- 5 said nucleotide sequence also having a G and C content in the range 40% to 60%, preferably at least 50%, of the totality of nucleotides from which it is constituted.
24. A modified vector according to claim 25, characterized in that the said second polypeptide sequence is in accordance with that defined in any one of claims 2 to 10 11.
25. A modified vector according to claim 23, characterized in that the second nucleotide sequence is a synthetic sequence.
26. A modified vector according to any one of claims 23 to 25, characterized in that the first nucleotide sequence codes for a signal peptide from *Plasmodium vivax* 15 and normally associated with the *Plasmodium* MSP-1 protein.
27. A modified vector according to any one of claims 23 to 26, characterized in that the second nucleotide sequence is deprived at its 3' terminal end of the hydrophobic C-terminal end sequence which is implicated in induction of anchoring said recombinant protein to the cell membrane of the host in which 20 it is expressed, in particular in a cell of an insect infectable by a baculovirus.
28. A modified vector according to any one of claims 23 to 27, characterized in that it consists of a modified baculovirus.
29. An organism, in particular an Sf9 type insect cell, transfectable and transfected by the modified vector according to any one of claims 23 to 27.
- 25 30. A synthetic DNA containing a first nucleotide sequence of which at least a portion codes for the peptide sequence:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[amended page]

- either of a 19 kilodalton (p19) C-terminal fragment of the surface protein 1 of the merozoite form (MSP-1 protein) of *Plasmodium falciparum*, said C-terminal fragment remaining normally anchored to the parasite surface at the end of its penetration phase into human erythrocytes in the event of an infectious cycle;
 - or of a portion of that peptide fragment provided that the expression product of said DNA in a baculovirus system is also capable of inducing an immune response which can inhibit *in vivo* parasitemia due to the corresponding parasite;
 - or of a peptide capable of inducing a cellular and/or humoral type immunological response equivalent to that produced by said p19 peptide fragment or said portion of that fragment; and
- said nucleotide sequence also having a G and C nucleotide content in the range 40% to 60%, preferably at least 50%, of the totality of nucleotides from which said synthetic DNA is constituted.
31. A synthetic DNA sequence according to claim 30, characterized in that its first nucleotide sequence is deprived at its 3' terminal end of the sequence coding for the hydrophobic C-terminal end region normally implicated in inducing anchoring of the p19 protein to the cell membrane of the host in which it is expressed, in particular in a cell of an insect infectable by a baculovirus.
32. A synthetic DNA sequence according to claim 30 or claim 31, characterized in that the first nucleotide sequence is preceded by a signal nucleotide sequence coding for a signal peptide normally associated with a *Plasmodium* MSP-1 protein, homologous or heterologous relative to the principal sequence.
33. A synthetic DNA sequence according to claim 32, characterized in that the signal sequence originates from *P. vivax*.

[end of amended page]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

[amended page]

34. A synthetic DNA according to any one of claims 30 to 33, characterized in that said first nucleotide sequence includes a 3'-terminal sequence coding for a polypeptide cell membrane anchoring region, said anchoring region fixing the expressed recombinant protein to the surface of the membrane of the host cell transformed with a vector containing said synthetic DNA, said 3' sequence being homologous to that of the principal nucleotide sequence, or heterologous, in particular that from *P. vivax*.
35. A synthetic DNA according to claim 34, characterized in that the 3'-terminal sequence originates from *P. vivax*.
36. A synthetic DNA sequence according to any one of claims 30 to 34, characterized in that it is deprived of said 3'-terminal sequence.
37. A baculovirus type vector according to claim 23, characterized in that it is selected from:
- the virus deposited at the CNCM [Collection Nationale de Cultures de Microorganismes; National Collection of Microorganism Cultures] with registration number I-1659;
 - the virus deposited at the CNCM with registration number I-1660;
 - the virus deposited at the CNCM with registration number I-1661;
 - the virus deposited at the CNCM with registration number I-1662;
 - the virus deposited at the CNCM with registration number I-1663.
38. A hybridoma secreting monoclonal antibodies having the specifications of the antibodies of any one of claims 19 to 21.
39. A process for separating a p19 peptide with a given specificity from a mixture of peptides, characterized by bringing said peptide mixture into contact with a corresponding antibody, in accordance with any one of claims 18 to 21, preferably already fixed on an insoluble support, by subsequently dissociating the antigen-antibody compound formed and by recovering the purified p19 peptide.

[end of amended page]

THIS PAGE BLANK (USPTO)